

Eukarióta dUTPázok szerkezet- és funkcióvizsgálata oldatfázisban

Doktori értekezés

Dubrovay Zsófia

okleveles vegyész

Témavezető:

Dr. Vértessy G. Beáta

A biológiai tudományok doktora, tudományos tanácsadó

Doktori iskola vezető:

Prof. Erdei Anna

Az MTA levelező tagja, tanszékvezető egyetemi tanár

Doktori program vezető:

Prof. Gráf László

Az MTA rendes tagja, tanszékvezető egyetemi tanár



Eötvös Loránd Tudományegyetem, Biológia Doktori Iskola, Szerkezeti Biokémia Program



Készült:

Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Enzimológiai Intézetének
Genom Metabolizmus és DNS javítás csoportjában

Köszönetnyilvánítás

Elsőként szeretném kifejezni köszönetemet témavezetőmnek, **Dr. Vértessy Beátának**, hogy megteremtette a lehetőséget és az inspiráló közeget munkámhoz, valamint szakértelmével, ösztönző erejével és hasznos tanácsaival segítette munkámat a kutatási folyamat során.

Köszönöm kollégáimnak, a csoport többi tagjának a fehérje előállításban, tisztításban végzett munkájukat, építő tanácsaikat, hozzászólásaikat: **Zagyva Imrének, Dr. Kovári Júliának, Dr. Barabás Orsolyának, Dr. Beke Angélnak, Dr. Takács Enikőnek, Németh (Pongrácz) Veronikának, Muha Villőnek és Nagy Ágnesnek.**

Köszönettel tartozom az NMR-es mérések lehetővé tételéért és az eredmények kiértékelésében való segítségért **Prof. Perczel Andrásnak és Dr. Gáspári Zoltánnak.**

Hálásan köszönöm a tömegspektrometriás méréseket **Dr. Hunyadi-Gulyás Évának.**

Köszönöm **Dr. Ágoston Csabának és Koch Lászlónak**, a Környezetvédelmi Intézet munkatársainak az ICP-AES méréseket.

Köszönöm az Enzimológiai Intézet volt és jelenlegi igazgatójának, **Prof. Friedrich Péternek és Prof. Závodszy Péternek**, hogy az Intézetben dolgozhattam.

Köszönettel tartozom korábbi diplomamunka témavezetőmnek, **Prof. Szalay Péternek** a szemléletmódért és az elméleti alapokért, amiket tőle tanultam.

Köszönöm a Richter Gedeon Nyrt. Szerkezetkutatási Osztálya dolgozóinak az inspiráló közeget, hasznos tanácsaikat: **Prof. Szántay Csabának, Balogh Gábornak, Dr. Béni Zoltánnak és Dr. Szakács Zoltánnak.**

Köszönöm családomnak, kisfiaimnak, **Gergőnek és Bulcsúnak**, hogy megértéssel viseltettek irántam munkám során, barátaimnak, akik lelkieben támogattak, mellettem álltak, ösztönöztek.

Tartalomjegyzék

Köszönetnyilvánítás	2
Tartalomjegyzék	3
Ábrák jegyzéke	5
Táblázatok jegyzéke	6
Rövidítések jegyzéke	7
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. Fehérjeszerkezet-vizsgálat NMR spektroszkópiával	11
2.2. Fémion-kofaktorok szerepe a foszfátészter hidrolízist katalizáló enzimek működésében	12
2.3. A dUTPáz enzim	19
3.3.1. <i>A dUTPáz élettani szerepe</i>	19
3.3.2. <i>A dUTPáz szerkezete és katalitikus funkciója</i>	22
2.4. Célkitűzések és a kísérletek racionális tervezése	29
3. MÓDSZEREK	29
3.1. Anyagok	29
3.1.1. Anyagok származása	29
3.1.2. Anyagok tisztaságának jellemzése	29
3.1.2.1. <i>Induktív csatolású plazma atomemissziós spektroszkópia (ICP-AES)</i>	29
3.2. Fehérjetermelés, tisztítás	29
3.2.1. Expresszió	29
3.2.2. Tisztítás	30
3.3. A fehérjeminta jellemzése	31
3.3.1. SDS gélelektroforézis	31
3.3.2. Tömegspektrometria (MS)	31
3.3.3. Koncentrációmeghatározás	31
3.3.4. Aktivitásmérés	32
3.4. Szerkezetvizsgálat mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR)	33
3.5. Szerkezetvizsgálat cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával (CD)	33
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELESÜK	35
4.1. A flexibilis C-terminális 5. motívumbeli nyolc konzervált	

aminosav azonosítása	35
4.2. Titrálás nukleotidokkal	40
4.3. Szubsztráttelítési görbe	42
4.4. Szerkezeti modell	43
4.5. Fémionok szerepe a katalízisben	50
4.5.1. <i>Kinetikai tulajdonságok</i>	50
4.6. Fémionok szerepe a szerkezetstabilizálásban	56
5. ÖSSZEFOGLALÁS	60
6. SUMMARY	61
7. IRODALOMJEGYZÉK	62
8. KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA	68

Ábrák jegyzéke

- 1.1. ábra - A dUTPáz által katalizált hidrolízis
- 1.2. ábra - A homotrimer dUTPázok központi csatornája
- 2.1. ábra - Foszfátészter hidrolízis mechanizmusok
- 2.2. ábra - A kértétkű fémion lehetséges szerepei a foszfát diészter hidrolízisben
- 2.3. ábra - RNáz H szerkezeti és katalitikus tulajdonságai
- 2.4. ábra - MutH nukleáz mechanizmus
- 2.5. ábra - Nukleáz feltételezett mechanizmus, hasonlóság restrikciós endonukleázokkal
- 2.6. ábra - Az Ape1 és az endonukleáz IV fémion kofaktorainak szerepe a katalízis mechanizmusában
- 2.7. ábra - A dUTPáz által katalizált hidrolízis mechanizmusa
- 2.8. ábra - A DNS-t felépítő nukleotidok bázis párosodási elve - A citozin oxidatív dezaminálódása
- 2.9. ábra - A dUTPáz enzim kettős szerepe a DNS sértetlenségének megőrzésében
- 2.10. ábra - A dTTP *de novo* bioszintézise
- 2.11. ábra - Rákellenes terápiával előidézett timinmentes sejthalál
- 2.12. ábra - Konzervált szekvencia motívumok a dUTPázok első két fő csoportjában
- 2.13. ábra - A homotrimer dUTPáz enzim felépítése
- 2.14. ábra - Különböző fajokban található dUTPáz szekvenciák
- 2.15. ábra - A fehérje alegységek konzervált motívumainak szerepe az aktív centrum kialakításában, és a szubsztát megkötésében
- 2.16. ábra - A pro- és eukarióta dUTPázok katalitikus ciklusa
- 3.1. ábra - Fehérjék másodlagos szerkezeti elemeire jellemző CD spektrumok
- 4.1. ábra - Az SD dUTPáz ^1H spektruma
- 4.2. ábra - Az SD dUTPáz NOESY spektruma ($t_{\text{mix}}=85$ ms)
- 4.3. ábra - NOESY és TOCSY sematikus ábrázolás
- 4.4. ábra - A *D. melanogaster* dUTPáz ^1H - ^{15}N HSQC spektruma önmagában (A), valamint α,β -imido-dUTP (B), dUDP (C) és dUMP (D) szubsztátokkal
- 4.5. ábra - A ^1H - ^{15}N HSQC csúcsok intenzitásváltozása a *D. melanogaster* dUTPáz nukleotidokkal való titrálása hatására
- 4.6. ábra - A *D. melanogaster* dUTPáz szubsztátellítési görbéje
- 4.7. ábra - A *D. melanogaster* dUTPáz nukleotid indukált konformációs változásainak szerkezeti modellje
- 4.8. ábra - A Mg^{2+} és a Ca^{2+} hatása az *E. coli* és a *D. melanogaster* dUTPáz kinetikai állandóira
- 4.9. ábra - A *D. melanogaster* dUTPáz modellezett szerkezete
- 4.10. ábra - A FIV és a *D. melanogaster* dUTPáz egymáshoz illesztett szerkezete
- 4.11. ábra - Különböző fajokban található dUTPáz szekvenciák
- 4.12. ábra - A: CD differenciaspektrumok SD dUTPázzal B: CD differenciaspektrumok *E. coli* dUTPázzal

Táblázatok jegyzéke

4.1. táblázat - Aminosavak típusok szerint

4.2. táblázat - A dUPNPP szubsztrátanalóg és a (*D. melanogaster* dUTPáz) aminosav oldalláncok közötti kölcsönhatások

4.3. táblázat - A C-terminális kar és a másik két alegység aminosav oldalláncainak kölcsönhatása (*D. melanogaster* dUTPáz)

4.4. táblázat - A dUPNPP szubsztrátanalóg és a humán dUTPáz aminosav oldalláncai közötti kölcsönhatások

4.5. táblázat - A C-terminális kar és a másik két alegység aminosav oldalláncainak kölcsönhatása a humán dUTPázban

4.6. táblázat - Az SD dUTPáz kinetikai paraméterei kétértékű fémionokkal

4.7. táblázat - Az *E. coli* dUTPáz kinetikai paraméterei kétértékű fémionokkal

4.8. táblázat - Relatív aktivitásváltozás kalciumion hatására

4.9. táblázat - Kompetíciós mérések: kinetikai paraméterek 5mM Mg^{2+} és 5mM egyéb fémion jelenlétében

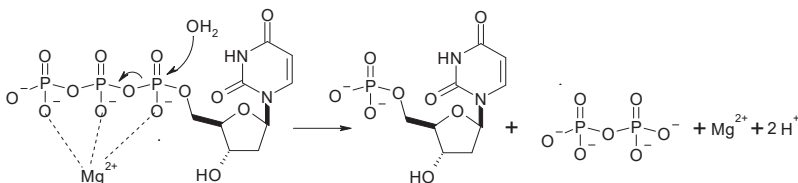
Rövidítések jegyzéke

AP	Alkalikus foszfatáz
BER	Basis exclusion repair (Báziskivágáson alapuló javítómechanizmus)
CD	Cirkuláris dikroizmus
C-terminális	Karboxi-terminális
dCMP	dezoxicitidin-monofoszfát
DNS	dezoxiribonukleinsav
NTP	nukleotid-trifoszfát
DTT	1,4-Ditiotreitol
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
dUDP	dezoxiuridin-difoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
dUPNPP	Dezoxiuridin- α , β -imidodifoszfát
dUTP	dezoxiuridin-trifoszfát
dUTPáz	dezoxiuridin-trifoszfát-nukleotido-hidroláz
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i> (ecetmuslica)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> baktérium
EDTA	etilén-diamin-N,N,N',N'-tetraecetsav
EIAV	Equine Infectious Anaemia Virus (Lovak vészes vérszegénységét okozó vírusa)
FIV	Feline Immunodeficiency Virus (Macskafélék Immunhiányt kiváltó vírusa)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Gyors fehérje-elválasztási folyadék kromatográfia)
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
ICP-AES	Induktív csatolású plazma atomemissziós spektroszkópia
IPTG	Izopropil- β -D-tiogalaktozid
k_{cat}	specifikus aktivitás
K_M	Michaelis-állandó
LB	Luria-Bertani
LD dUTPáz	Hosszú <i>D. melanogaster</i> dUTPáz (teljes 1-188 aminosavszekvencia)

MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight
MPMV	<i>Mason Pfizer monkey virus</i>
MPMV-NC	<i>Mason Pfizer monkey virus</i> nukleokapszid domén
MS	Mass spectrometry (Tömegspektrometria)
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NMR	Nuclear magnetic resonance spectroscopy (Mágneses magrezonancia spektroszkópia)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
N-terminális	Amino-terminális
OD	Optikai denzitás
<i>P. fal.</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
PDB	Protein Data Bank (Fehérjeszerkezeti adatbázis)
PMSF	fenilmetánszulfonil-fluorid
PP _i	szervetlen pirofoszfát
RNáz	Ribonukleáz
SD dUTPáz	Rövid <i>D. melanogaster</i> dUTPáz (1-161 aminosavat tartalmazó szekvencia)
SDS	Nátrium dodecil-szulfát
TES	N-tris[hidroxietil]metil-2-amino-etán szulfonsav
TMS	tetrametil-szilán
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
Tris	aminometántriil-trimetanol, tris(hidroximetil)aminometán
UV	utraibolya

1. Bevezetés

A deoxiuridin-trifoszfát nukleotido-hidroláz (dUTPáz) enzim esszenciális mind a prokariótákban, mind az eukarióta szervezetekben, sőt sok vírus is kódolja genomjában saját dUTPázát, valamint nullmutációja több fajban letális (1, 2). Eme enzim a dUTP dUMP-vé és pirofoszfáttá való hidrolizisét katalizálva hozzájárul a dUTP/dTTP megfelelően alacsony arány fenntartásához a sejtben (3) (1.1. ábra).



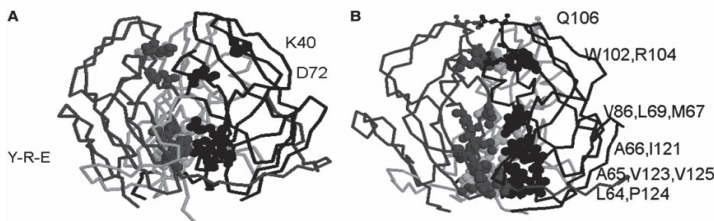
1.1. ábra A dUTPáz által katalizált hidrolízis: A reakció során az aktivált vízmolekula nukleofil támadást kezdeményez a dUTP α-foszfátján, termék a dUMP és a pirofoszfát

A dUTPáz enzimcsalád, meghiúsítván az uracil beépülését a DNS-be, annak egységét biztosítja, hiányában létrejön az ún. timinmentes sejthalál. Az enzim gátlása vírussal fertőzött ill. rákos sejtekben azok halálához vezet, ezért a dUTPáz új célpont lehet antivirális ill. antitumor hatású gyógyszerek tervezésében. A megfelelő gyógyszertervezésnek fontos feltétele, hogy az enzim katalitikus mechanizmusát, illetve különböző evolúciós utakon fejlődött dUTPázok közti különbségeket megismerjük. Célunk volt felderíteni a különböző fejlettségi fokon álló dUTPázok katalitikus mechanizmusa és szerkezete közti kapcsolatot.

A szerkezet - funkció kapcsolatban igen jelentős szerepe van a fémkofaktornak, esetünkben a Mg²⁺-ionnak, amelynek vizsgálatát ezért rendkívül fontosnak tartottuk. Meglepő ugyanis, hogy a dUTPáz katalízis hatékonyságát a fémion csak egy nagyságrenddel növeli meg, míg ez más fémkofaktorról működő enzimek esetében általában több nagyságrend (4, 5, 6). Ezért vizsgáltam más fémionok hatását is az enzim katalitikus hatékonyságára.

A fehérje szerkezete is rendkívül érdekes, egyedülálló: a legtöbb dUTPáz homotrimer, három szimmetrikus katalitikus helyének fölépítésében mindhárom alegység részt vesz. A trimer egységet három intermolekuláris kölcsönható felszín tartja össze: a szomszédos alegységek közti felszín, a szomszédos monomer fölé hajló C-terminális kar és az enzim központi csatornája. A pro-

és eukarióta dUTPázok között polarításban is jelentős különbség van, prokariótáknál a három alegységből álló homotrimer központi csatornája apoláris, szűk, míg eukariótáknál poláris, és kevésbé szűk, hiszen beférnek víz molekulák és egy magnéziumion is (1.2. ábra). A polaritásbeli különbség okozhat szerkezetbeli stabilitási különbségeket (termodinamikai paraméterek), valamint közvetve oka lehet a különböző fajokból származó enzimek hatékonyságbeli különbségeinek is, ezért vizsgáltam a különböző szempontok szerint kiválasztott fémionok hatását a pro- és az eukarióta dUTPázra.



1.2. ábra A homotrimer dUTPázok központi csatornája A homotrimer enzimek alegységeinek főláncai fekete, sötétszürke és világosszürke színű pálcikamoddellel szerepelnek az ábrán. A csatornát alkotó aminosav oldalláncok térkitöltő modellel vannak feltüntetve, melyeket egybetűs kódjuk, valamint a szekvenciában elfoglalt sorszáruk alapján lehet azonosítani. Az aminosavak színezése az alegységeknek megfelelően történt. **(A) A humán dUTPáz poláros központi csatornája (humán dUTPáz 1Q5U PDB jelű szerkezet alapján).** A csatorna egyik bejáratát felépítő Y-R-E aminosavak H-idas kölcsönhatásban állnak egymással. **(B) Az apoláros központi magú *E. coli* dUTPáz (*E. coli* dUTPáz 1DUD PDB jelű szerkezet alapján).** A központi magban található két poláros aminosavoldalláncot (Q106 és R104) pálcika és gömb modell jelöli. Az eukarióta hidrofíl Y-R-E aminosavaknak a prokarióta hidrofób A-M-V aminosavhármass felel meg.

Mivel a dUTPáz enzimesalád tagjainak mérete 60 kDa körüli, a rendelkezésünkre álló 500 Mz-es NMR készüléken teljes háromdimenziós szerkezetmeghatározásuk nem volt lehetséges. Röntgenkristallográfia segítségével ugyan nyerhetünk atomi felbontású szerkezetet, ezek azonban nem mindig árulnak el mindent a molekula *in vivo* állapotáról, mivel a sejtben a folyamatok oldatfázisban zajlanak. Ezért a szubsztrát – enzim (C-terminális kar) kölcsönhatások vizsgálatára az oldatfázisú NMR spektroszkópiát választottam, amely meglehetősen érzékeny molekuláris kölcsönhatások, dinamika vizsgálatára.

2. Irodalmi áttekintés

2. 1. Fehérjeszerkezetvizsgálat NMR spektroszkópiával

Fehérjék háromdimenziós szerkezetmeghatározására jelenleg két olyan módszert ismerünk, melyek révén nagyfelbontású információt nyerhetünk. Egyik ezek közül a röntgenkristallográfia, amellyel szilárd fázisú szerkezeteket tudunk meghatározni. Ebben az esetben azonban mindenképpen egy rögzített konformációra nézve kapunk információt, amely a fehérje dinamikus működéséről nem ad teljes képet. Márpedig a fehérjék működésében természetesen a dinamika a meghatározó: minden működésben, legyen az enzimátikus katalízis, vagy ligand kötés, a fehérje mozgására, oldalláncok vagy a főlánc elmozdulására van szükség. A másik lehetséges módszer az oldatfázisú NMR spektroszkópia, melynek előnye az előzővel szemben, hogy ezekre a molekulamozgásokra, dinamikára vonatkozólag is nyerhetünk belőle információt.

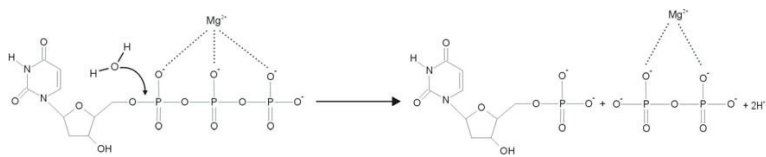
Manapság 15-35 kDa nagyságú fehérjék szerkezete 2,5 Å felbontással határozható meg NMR spektroszkópia segítségével, ami összemérhető a röntgenszerkezetek felbontásával. Az elméleti határ 60-70 kDa körül húzódik. Az irodalomban ismert például egy 30 kDa (kb.260 aminosav) méretű egyláncú fehérje teljes háromdimenziós szerkezetmegoldása multidimenzionális NMR-rel (7, 8). Természetesen, az oldatfázisú NMR-rel nem egy szerkezetet kapunk, hanem a feltekeredett, nem rendezetlen, de kis konformációs szabadsággal rendelkező fehérje konformációs csoporjait, (illetve ezek átlagát) amelyek egymásba alakulása NMR kémiai eltolódás időskálán folyadékfázisban általában gyors folyamat. A *D. melanogaster* dUTPáz 60 kDa méretű, szimmetrikus homotrimer, tehát a három alegység azonos jeleket adhat, de a trimer molekula nagysága miatt a T_2 relaxációs idők lecsökkennek, a jelek nagyon kiszélesednek, így teljes asszignációra nincs lehetőség. Az NMR spektroszkópia jól kiegészíti a röntgenkristallográfiát, hiszen a kristályszerkezetben épp a flexibilis részek nem látszanak, az NMR-ben viszont éppen flexibilitásuk miatt kevésbé hatnak kölcsön a fehérje globuláris magjával, ezért úgy viselkednek, mint egy peptid, élesebb jeleket adnak, lehetőséget nyújtva az asszignációra.

2. 2. Fémion-kofaktorok szerepe a foszfátészter hidrolízist katalizáló enzimek működésében

Az enzimek működésében nagyon sok esetben elengedhetetlen szerepet töltenek be a fémkofaktorok. A poláris, ionos oldalláncokhoz koordinálódva stabilizálhatják, illetve megváltoztathatják az enzim szerkezetét, segíthetik a szubsztrát kötődését, megváltoztatván az elektrosztatikus viszonyokat, sok nagyságrenddel megnövelhetik a reakció sebességét. A legtöbb fémionnal működő enzim fémion hiányában sok nagyságrenddel kevésbé hatékony, az enzim szinte végtelenül lassúvá válik, tehát elveszti kompetenciáját a sejtbeli folyamatokban. A fémionok közül elsősorban a kétértékűek játszanak fontos szerepet foszfátészter hidrolízist katalizáló enzimek esetében. Az alábbiakban néhány jellemző példát emelünk ki ezek közül. Például egy RNS foszfodiészter kötést hasító DNS enzim hatékonysága 10^7 -szeresére növekszik kétértékű fémion jelenlétében (Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} és Pb^{2+}) (6). Az ApeI (bázismentes helyen hasító endonukleáz) enzim specifikus aktivitása $<0,02$ % magnéziumion hiányában, mint magnéziumion jelenlétében (4). Az AP (alkalikus foszfátáz) enzim Mg^{2+} kötőhelyének eltávolításával az enzim k_{cat}/K_M értéke $5 \cdot 10^3$ -szorosára csökken (5).

A foszfátészterek hidrolízisének három különböző mechanizmusa létezik (9) (2.1. ábra):

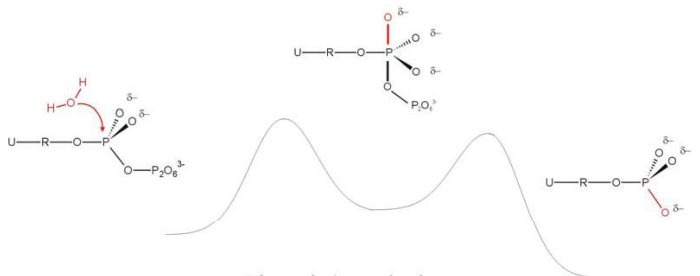
- Asszociatív útvonal (bimolekulás mechanizmus), amely a nukleofil támadással kezdődik, stabil pentakoordinált foszforán intermedier keletkezik, később távoznak a termékek. Ez a kétlépéses folyamat A_N+D_N reakcióként szerepel az irodalomban.
- Disszociatív útvonal, melyben az unimolekulás disszociációt követi a nukleofil támadás (D_N+A_N), a reakció a reaktív metafoszfát intermedieren keresztül zajlik, amely bármely közelben lévő nukleofillel reakcióba lép. A régi kötés hasadása és az új létrejötté két egymást követő lépésben zajlik.
- Az úgynevezett koncertikus reakció (szintén bimolekulás reakció), amelyben a régi kötés felhasadása és az új kialakulása egy lépésben zajlik, ez az úgynevezett A_ND_N mechanizmus, amely csak egy átmeneti állapottal jellemezhető, nincs köztitermék. A potenciális energia felület alakjától függően, azaz attól függően, hogy az átmeneti állapot geometriája a kiindulási vagy a végállapothoz hasonlít jobban, a reakció lehet asszociatíván vagy disszociatíván aktivált. Az asszociatív aktivációs módnál a reakciósebesség körülbelül annyira érzékeny a nukleofil támadó ágens változtatására, mint a távozócsoporthoz, míg a disszociatív aktivációs módnál sokkal érzékenyebb a távozócsoporthoz változtatására.



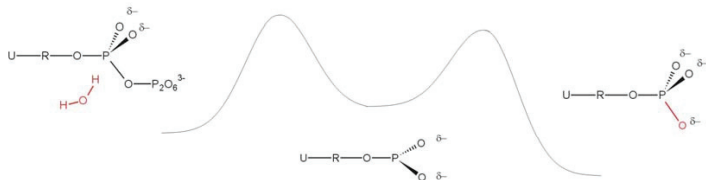
Reaktánsok

Asszociatív mechanizmus

Termékek



Disszociatív mechanizmus



Koncertikus mechanizmus

2.1. ábra Foszfátészter hidrolízis mechanizmusok

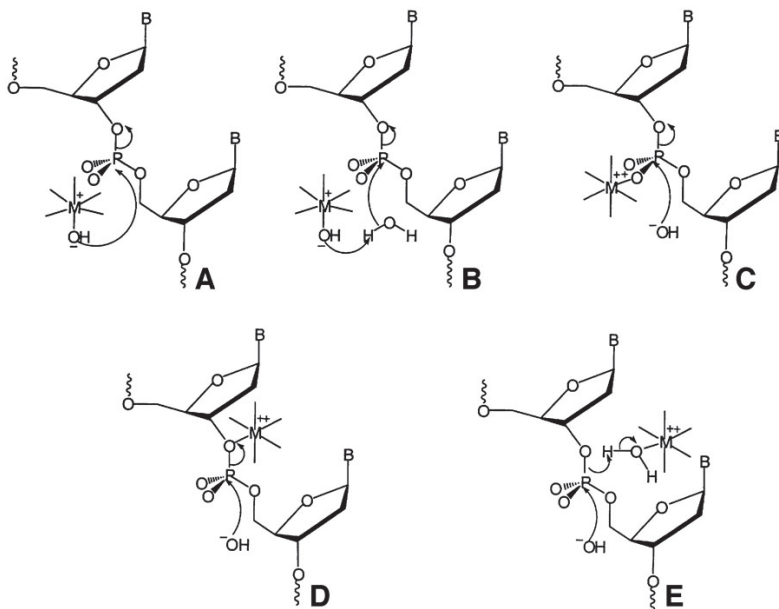
A foszforsavészter hidrolízis vákuumban és oldatfázisban valószínűleg a disszociatív mechanizmus szerint zajlik, míg a nukleotid-trifoszfátoknál az α - illetve a β -foszforatomon végbemenő enzim

által katalizált reakciók esetében az irodalom többé-kevésbé egybehangzóan állítja, hogy a reakciók döntően asszociatív mechanizmussal zajlanak (10), mivel a disszociatív mechanizmus által megkövetelt metafoszfát jellegű intermedierek rendkívül instabilak, amennyiben a foszforatom egyik kovalens liganduma nagy térigényű. A dUTP hidrolízise szintén asszociatív mechanizmussal játszódik le (11).

A foszfátészter hidrolízisben a következő szereplők játszanak fontos szerepet:

- nukleofil támadó ún. katalitikus víz vagy hidroxidion
- általános bázis, amely a nukleofil aktiválja
- általános sav
- a távozócsoport aktivátor
- elektrofil (Lewis sav), amely az áthidaló helyzetű foszfáttoxigént stabilizálja

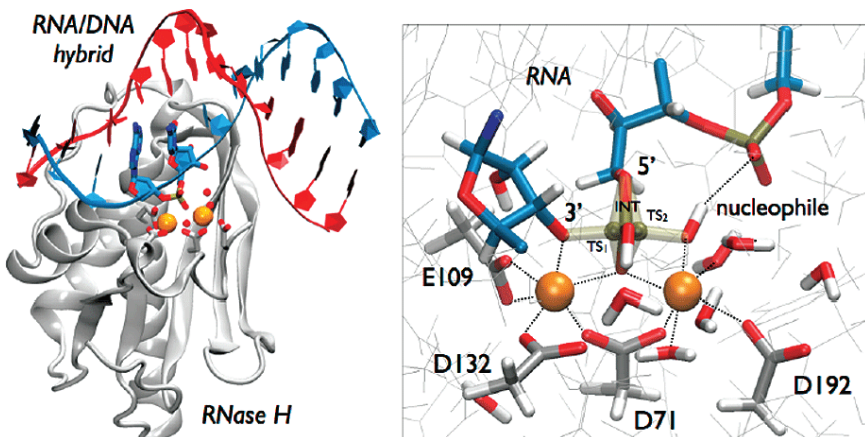
A támadásért felelős ún. katalitikus vízmolekula aktiválása tehát központi jelentőségű. Ebben gyakran a fémion közvetlen koordinálása játszik döntő szerepet. A fémion kofaktor sokféle szerepet tölthet be az enzimatis foszfátészter hidrolízisben (12) (2.2. ábra).



2.2. ábra A kétértékű fémion lehetséges szerepei a foszfát diészter hidrolízisben (A) A fémion által koordinált hidroxid/víz a nukleofil a reakcióban (B) A fémion által koordinált hidroxid az általános bázis (C) A fémion koordinálja az egyik nem áthidaló foszfát oxigént, mint Lewis sav katalizátor (D) A fémion aktiválja a távozócsoportot (E) A fémion által koordinált vízmolekula az általános sav. Az ábra a 12-es referenciából származik.

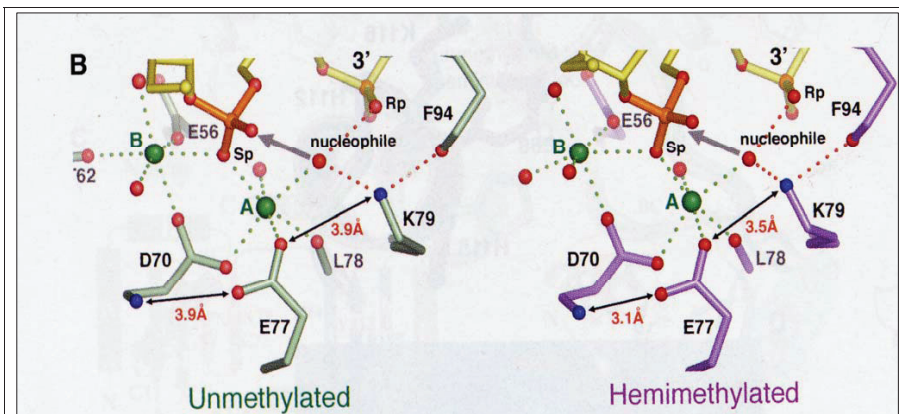
A fenti lehetséges szerepek közül, mint alább láthatjuk, vannak, amelyeket egyszerre is betölthet egy fémion, például lehet egyszerre a nukleofilt koordináló és Lewis sav katalizátor, lehet Lewis sav katalizátor és távozócsoport aktivátor. Vannak szerepek, amelyeket nem tölthet be egyszerre, például nem lehet egyszerre nukleofil és általános bázis, valamint általános sav és távozócsoport aktivátor sem, ilyen esetekben az enzim két fémion-kofaktort használ.

Például az RNáz H (13) esetében két Mg^{2+} kofaktor is jelen van, az egyik koordinálja a katalitikus vízmolekulát, ezen kívül még két vízmolekulát, két konzervált karboxilát oldalláncot (D71, D192) és az egyik nem áthidaló foszfát oxigént, a másik három karboxilát oldalláncot (E109, D132, D71), a ribóz 3' oxigénjét és szintén az egyik nem áthidaló foszfát oxigént (2.3. ábra).

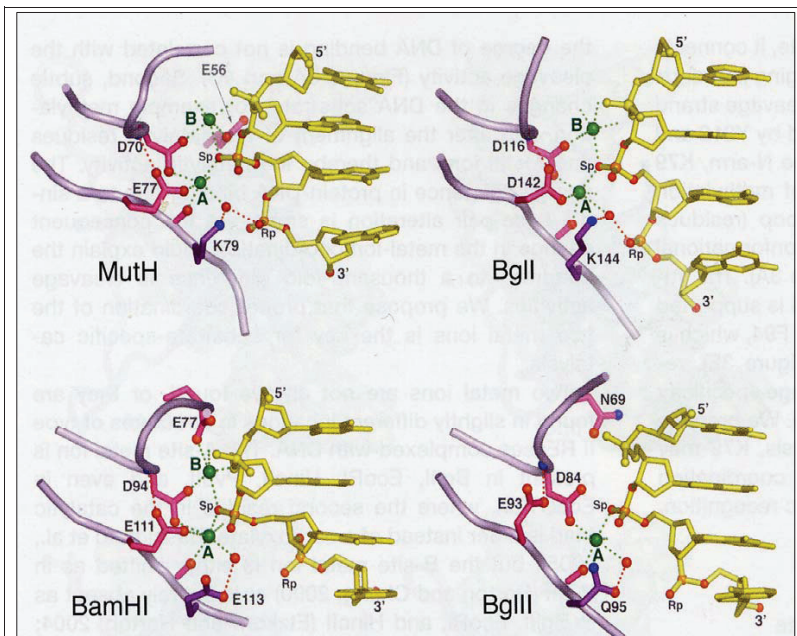


2.3. ábra RNáz H szerkezeti és katalitikus tulajdonságai Balra: RNáz H RNS/DNS hibriddel alkotott komplexe, RNáz H szürke, DNS piros, RNS kék, Mg^{2+} narancs, jobbra: RNáz H katalitikus helye kinagyítva: RNS szállal, két Mg^{2+} kofaktorról és a katalitikus vízzel. Az ábra a 13-as referenciából származik.

A MutH nukleáz esetében két Ca^{2+} ion kofaktor van jelen, ezek közül az egyik aktiválja a nukleofilt (14) (2.4. ábra). Hasonlóképpen a restrikciós endonukleázoknál is megtalálható a két fémion-kofaktor, például a BglI és a BamHI endonukleáznál, itt is többféle szerepet töltenek be, aktiválják a katalitikus vizet, Lewis savként viselkednek, koordinálják a karboxilát oldalláncokat (15-17) (2.5. ábra).



2.4. ábra MutH nukleáz mechanizmus Az ábra a 14-es referenciából származik. Sárga pálcikamodell: nukleinsav, zöld és lila pálcikamodell: enzimoldallancok, zöld gömb: kalciumion-kofaktor, piros gömb: vízmolekula

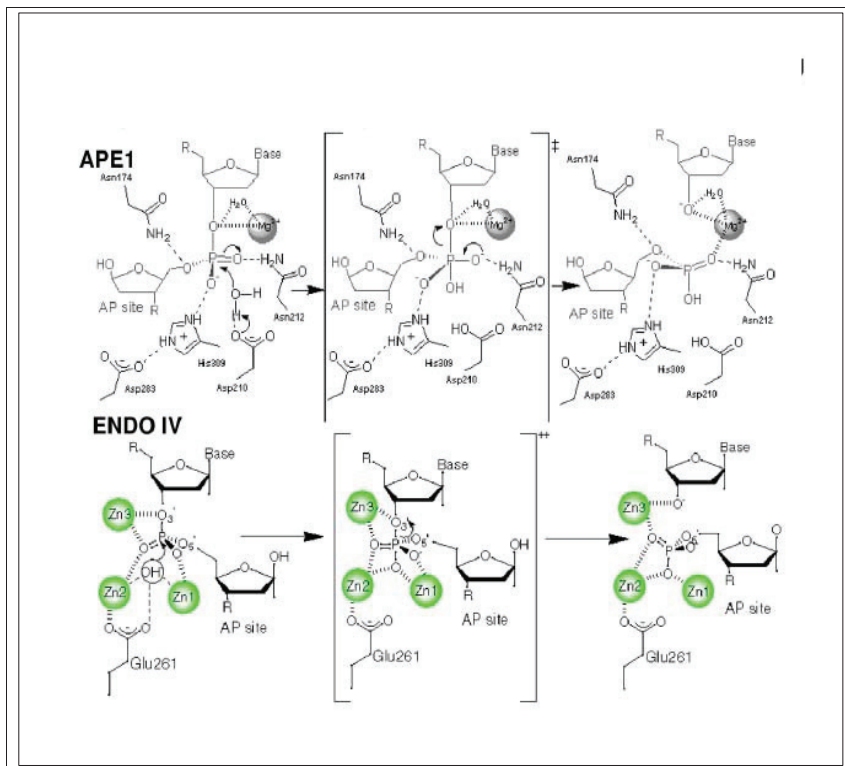


2.5. ábra Nukleáz feltételezett mechanizmus, hasonlóság restriktív endonukleázokkal. Az ábra a 14-es referenciából származik. Sárga pálcikamodell: nukleinsav, lila szalag: enzim főlánc, rózsaszín pálcikamodell:

enzimoldallancok, zöld gömb: fémion-kofaktor, piros gömb: vízmolekula

Ezekben az esetekben általában az a jellemző, hogy a koordinált fémion (ami élettanilag leggyakrabban Mg^{2+} , Ca^{2+} ill. Zn^{2+}) a nukleofil támadásért felelős vízmolekula közvetlen koordinációs szférájában található.

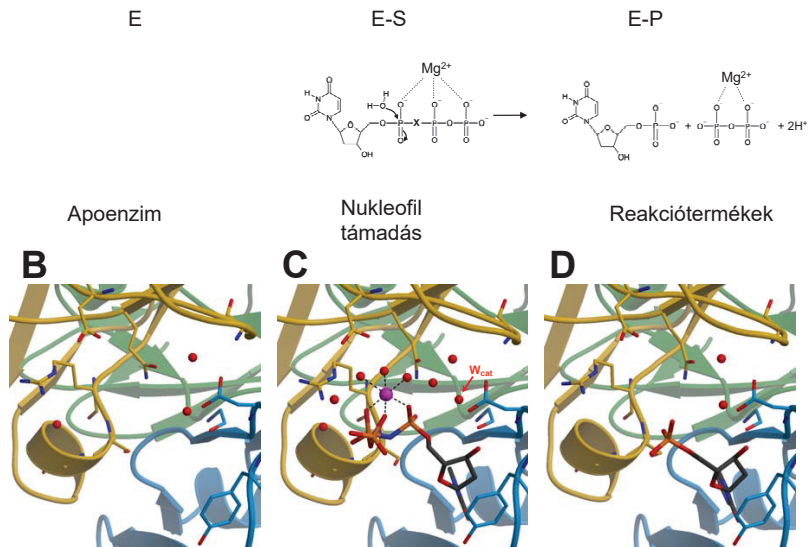
Az Ape1 és az endonukleáz IV is fémiont használ a 3'-OH távozócsoport stabilizálására, a katalitikus vízmolekulát az Ape1 esetében egy aszpartát oldallánc, az endonukleáz IV esetében pedig egy másik fémion (Zn^{2+}) aktiválja (18) (2.6.ábra).



2.6. ábra Az Ape1 és az endonukleáz IV fémion kofaktorainak szerepe a katalízis mechanizmusában
Az ábra a 18-as referenciából származik.

Ezzel szemben a dUTPázok esetében a fémion az alábbi módon koordinálódik: Mindhárom foszfátcsoport egy-egy nem áthidaló oxigénje és három vízmolekula alkotja a Mg^{2+} -körüli oktaéderes koordinációs szférát az aktív centrumon belül (11) (2.7. ábra).

A



2.7. ábra A dUTPáz által katalizált hidrolízis mechanizmusa (ábra a 11-es referencia alapján)

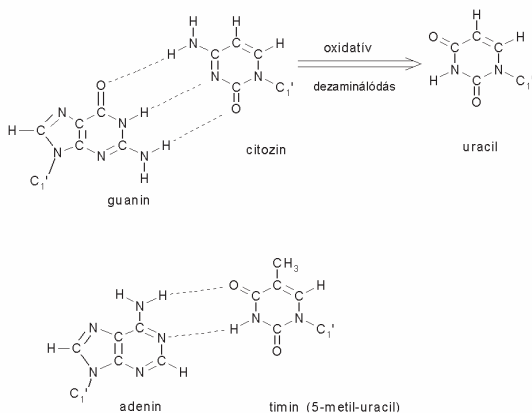
Ez a hármas koordináció DNS polimerázok esetében is megfigyelhető. A dUTPázoknál a nukleofil támadásért felelős vízmolekulát tehát nem a fémion aktiválja, hanem egy szigorúan konzervált Asp oldallánc. Talán ezzel magyarázható, hogy korábbi cikkekben leírták, miszerint dUTPázok kétértékű fémionok távollétében is képesek jelentős mértékű katalitikus aktivitásra (3).

2.3. A dUTPáz enzim

2.3.1. Élettani szerepe

A Földünkön kialakult élet fennmaradásáért és fejlődéséért a rendkívül bonyolult és sérülékeny DNS molekula a felelős. A DNS-ben kódolt genetikai információ pontos átadása érdekében a sejtben rengeteg ellenőrző, irányító és javító mechanizmusra van szükség.

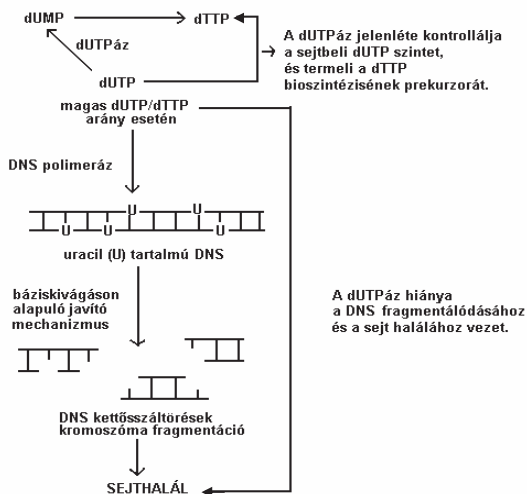
Ahhoz, hogy megértsük a dUTPáz jelentőségét, vessük górcső alá azt a kérdést, miért is nincs uracil a DNS-ben. A válasz a citozin kémiai instabilitásában rejlik, ugyanis a citozin spontán oxidatív dezaminálódásával uracil jön létre (19, 20) (2.8. ábra).



2.8. ábra - A DNS-t felépítő nukleotidok bázispárosodási elve - A citozin oxidatív dezaminálódása A guaninnal bázispárt alkotó citozin oxidatív dezaminálásával keletkező uracil – a timinhez hasonlóan – adeninnel képez H-hidakat

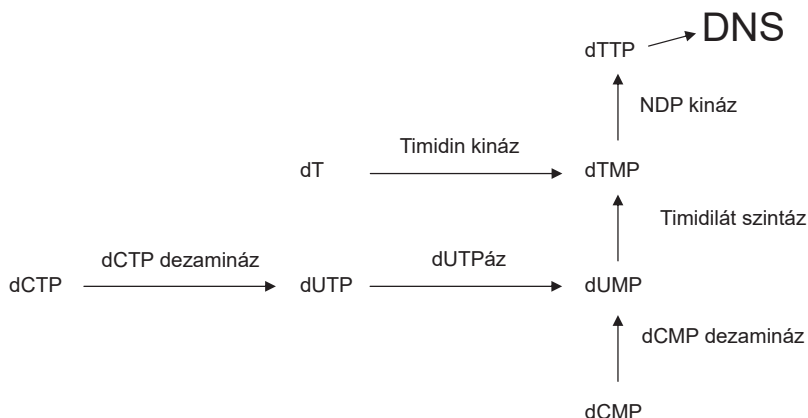
Ez a folyamat rendkívül gyakori, pl. egy emlős méretű genomban naponta több száz citozin alakul uracillá. A citozint helyettesítő uracil mutagén a DNS-ben, hiszen bázispárja guanin helyett adenin lesz, azaz megváltozik a genetikai kód. Ekkor a DNS-ben levő uracilt a báziskivágáson alapuló javítómechanizmus (BER) hibaként érzékeli, és kivágja. Uracil már a DNS szintézisekor is kerülhet a timin helyére, hiszen a DNS polimerázok kismértékű szelektivitásuk folytán nem ismerik fel az uracil és a timin közti különbséget. Ez a helyettesítés nem mutagén, hiszen az uracil párja szintén adenin, viszont a javítómechanizmus nem „nézi” a másik szálát, nem „tudja”, hogy milyen uracil, és mi a párja, így mindenképpen kivágja a DNS szálból. Ez akkor probléma, ha a dUTP koncentrációja nagy a dTTP-hez képest, és újra uracil épül be a DNS-be. Ez egy hiábavaló ciklussá alakul, ami a kromoszóma fragmentálódásához, majd sejthalálhoz vezet, ez az ún. timinmentes sejthalál (3, 22)

(2.9. ábra).



2.9. ábra A dUTPáz enzim kettős szerepe a DNS sértetlenségének megőrzésében: Az enzim hiányában megnövekvő dUTP/dTTP arány a DNS-javító mechanizmust hiperaktív hiábavaló ciklusba kényszeríti, ami kromoszóma töredezettséghez, és végül a sejt halálához vezet

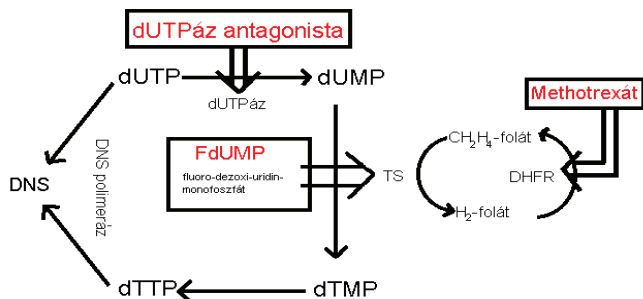
Ennek elkerülésére a megoldás a dUTPáz enzim, ami a dUTP hidrolizist katalizálja dUMP-vé és pirofoszfáttá. Mivel a dUMP a dTTP szintézis prekursora, így az enzim kétszeresen is hozzájárul a dUTP/dTTP arány megfelelően alacsony szinten tartásához a sejtben (0,05 - 0,07 emberi sejtekben) (21), és a nukleotid metabolizmusban is fontos szerepet tölt be (2.10. ábra).



2.10. ábra A dTTP *de novo* bioszintézise: A dUTP/dTTP arányt szabályozó két kulcsenzim a dUTPáz és a timidilát szintáz. A dCMP deamináz a legtöbb eukarióta szervezetben megtalálható, míg a dCTP deaminázt csak prokarióta szervezetekben azonosították.

A dUTPáz fontosságát támasztja alá az a tény, hogy igen limitált genommal rendelkező vírusok (egyes lentivírusok, B és D típusú onkovírusok) (23, 24) is kódolják saját genomjukban dUTPázukat. A virális dUTPáz elsősorban azon vírusok számára jelentős, melyek differenciált (ezért csekély DNS szintézist folytató) sejteket támadnak meg, ugyanis az ilyen gazdasejtekben nagyon alacsony a dUTPáz koncentrációja (25). A virális dUTPáz gének nullmutációja csökkenti a vírus fertőző- és szaporodóképességét a differenciált gazdasejtekben, így a virális dUTPáz antagonistái terápiás jelentőséggel bírhatnak bizonyos vírusos megbetegedésekben.

A timinmentes sejthalál indukálása gyakran használt kemoterápiás módszer, mivel leginkább aktívan osztódó sejtekre hat. Eddig a timin metabolizmus más enzimjeinek gátlószereit alkalmazták, a dihidrofolát reduktáz gátlásáért felelős methotrexátot, valamint timidilát szintázt blokkoló 5-fluorouracilt és az 5-fluor-2'-deoxiuridint, melyek jelentősen megnövelik a sejtbeli dUTP/dTTP arányt (26). Ez a hatás aktívan osztódó, pl. tumoros ill. vírussal fertőzött sejtekben timinmentes sejthalálhoz vezetett (27). Ugyanakkor kimutatták, hogy a genetikailag előidézett megnövekedett dUTPáz szint egyes humán tumorsejtvonalakban fluorouracil rezisztenciát vált ki (28). Ebből következőleg a dUTPáz antagonizmus sikeres megoldás lehet a kemoterápiában. Erre vonatkozó kísérletek sikeresnek mutatkoztak humán rákos sejtvonalakon *in vitro* (29) (2.11.ábra).

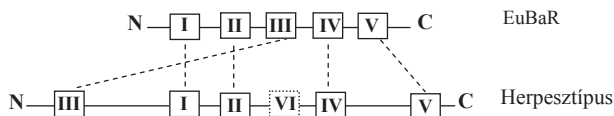


2.11. ábra Rákellenes terápiával előidézett timinmentes sejthalál: A napjainkban alkalmazott legelterjedtebb rákellenes gyógymódok a timin metabolizmusban résztvevő enzimek – a timidilát szintáz és a dihidrofolát redukáz – szelektív gátlásával érnek el eredményt - A dUTPáz gátlása kiegészítő, vagy önálló terápiaként is ígéretes

Manapság a tumor elleni terápiák nagy része igyekszik a rákos sejtekben előidézett programozott sejthalállal (apoptózis) véget vetni a káros sejtburjánzási folyamatnak. Ez azért nehéz feladat, mert a tumorsejtek már a létüket is annak köszönhetik, hogy bennük az apoptikus útvonalak jelentős része gátolt (30). Például az apoptózis egyik kulcsfehérjéje, a p53 rákos sejtekben gyakran funkcióvesztéssel járó mutációkkal rendelkezik. Ezért rendkívül jelentős az az eredmény, mely arról számol be, hogy vérképző (hematopoetikus) tumorsejtekben a dUTPáz gátlása által indukálható timinmentes sejthalál független a p53 által vezérelt útvonalaktól (31).

3.3.2. A dUTPáz szerkezete és katalitikus funkciója

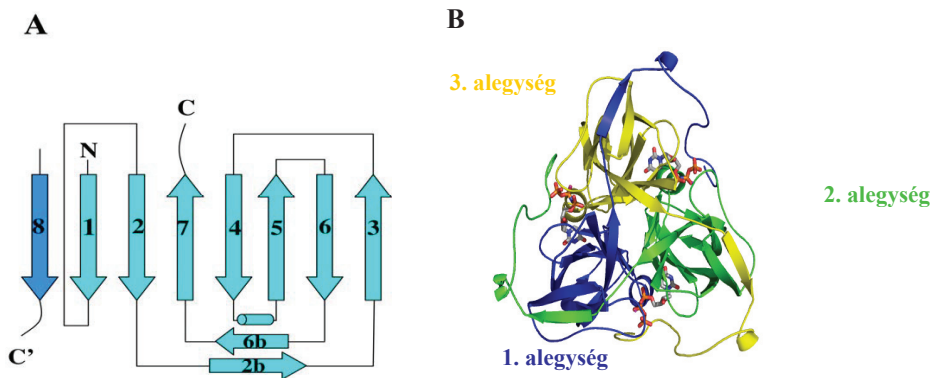
A dUTPázok elsődleges szerkezetük alapján három fő csoportba sorolhatók: az ún. EuBaR (eukarióta, bakteriális és retrovirális), a herpeszvírusokban, valamint az első kettőtől jelentősen eltérő szerkezetű, egysejtű parazitákban található dUTPázok, melyek homodimer szerveződésűek, és csekély szekvenciazonosságot mutatnak az első két család képviselőivel (2.12.ábra).



2.12. ábra Konzervált szekvencia motívumok a dUTPázok első két fő csoportjában: Pontozott négyszög: A

A herpeszvírusokban található dUTPázok monomer fehérjék, melyek feltehetően génduplikációt követő sorozatos mutációk során alakultak ki, ami a szekvencia motívumok eltérő sorrendjét eredményezte.

Az EuBaR típus képviselői (a továbbiakban csak ezekkel foglalkozom) homotrimer szerveződésűek, az alegységek 8 β -szála ún. „piskótatekercs” (jelly roll) módon tekeredik fel antiparalell β -lemezzé, melynek integráns eleme a szomszédos alegység egyik β -szála, így a trimer rendkívül stabil (32, 33). A hagyományos „lekvárostekercstől” annyiban tér el a szerkezet, hogy az első β -szál iránya a dUTPázokban ellentétes, a nyolcadik szál pedig nem a saját, hanem a szomszédos alegységből származik (2.13.ábra).



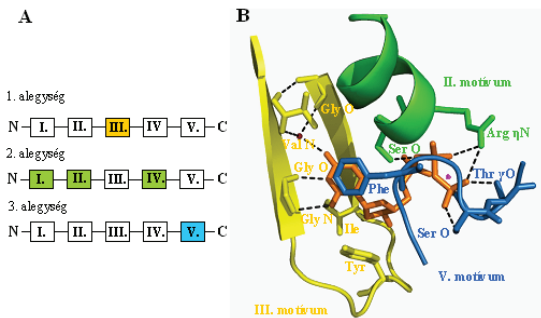
2.13. ábra A homotrimer dUTPáz enzim felépítése (A) A homotrimer dUTPázokra jellemző "lekváros tekeres" fold sematikus ábrázolása. Az egyes β -szálakat számozott nyílak jelölik, az α -hélixet pedig egy henger szimbolizálja. Az N, illetve C betű az amino-, valamint a karboxi-terminális fehérje véget jelzi. A szomszédos alegység beépülő nyolcadik β -szálát C' jelöli. (B) A homotrimer Mtb (*Mycobacterium tuberculosis*) dUTPáz:dUPNPP:Mg²⁺ komplex kristályszerkezete (PDB kód:2PY4). Az ábrán jól látható, hogy a klasszikus homotrimer dUTPáz szerkezetben mindhárom aktív centrum felépítésében mindhárom fehérje alegység részt vesz. A három fehérje alegység szalagmodellel ábrázolt peptidláncai különböző színekben láthatók (kék, zöld és sárga). Az aktív zsebekbe kötődő szubsztrátanalóg dUPNPP molekulákat pálcikamodell, a Mg²⁺ ionokat lila gömbök szemléltetik. Az ábrán szereplő különböző atomok színei: szén: szürke; oxigén: piros; nitrogén: kék és foszfor: narancssárga.

A viszonylag alacsony szekvenciaazonosság mellett a dUTPáz enzimesalád fehérjéinek feltekeredése minimális változtatásokkal örökött meg a retrovírusoktól az emberig (32-47). Az EuBaR dUTPáz enzimesalád minden tagját öt konzervált szekvenciamotívum jellemzi (2.14. ábra).

[illegible]

Ez az öt motívum kulcsfontosságú az aktív centrum fölépítésében. A katalitikus helyet a három alegység együttesen hozza létre oly módon, hogy minden egyes aktív hely felépítésében mindhárom alegység részt vesz: az egyik „adja” az I., II. és IV., a másik a III., a harmadik pedig az V. motívumot. A dUTPázok szubsztrátspecifitása kiemelkedő mind a bázis, mind a cukor, mind a foszfátlánc tekintetében (11, 35, 46), amely nélkülözhetetlen a más, szervezet számára létfontosságú nukleotidok energiapazarló hidrolizisének elkerülése végett. Ezt a nagyfokú szubsztrátspecifitást jól tükrözi, hogy például az *E. coli* dUTPáz esetében a k_{cat}/K_M értékek mind dTTP-re, mind dCTP-re több nagyságrenddel alacsonyabbak, mint dUTP-re nézve (39). Az aktív centrum magját két antiparallel β -szál, és az őket összekötő β -kanyar adja, amely a dezoxiribóz gyűrűt koordináló tirozint tartalmazza, a ribonukleotidok elhelyezkedése sztérikusán gátolt (36). Ez az antiparallel β -hajtű felelős az uracil koordinálásáért is, az uracil beékelődik, és a bázispárosodási mintázatnak megfelelően hidrogén-hidakkal kapcsolódik a főlánc atomokhoz. A bázispárosodásnak megfelelően szerkezetileg csak a timin beépülése lenne lehetséges, annak beékelődése a β -hajtűbe viszont metilcsoportja miatt sztérikusán gátolt. A foszfát felismerést egy másik alegység végzi: Gln (IV. motívum) Ne2 atomja és a Ser (II. motívum) főlánc NH-csoportja köti az α -foszfátcsoportot, míg az Arg (II. motívum) a β - γ -foszfát koordinálásában vesz részt. A harmadik alegység flexibilis C-terminális régiója, mely az V. konzervált szekvenciamotívumot tartalmazza, a szubsztrát

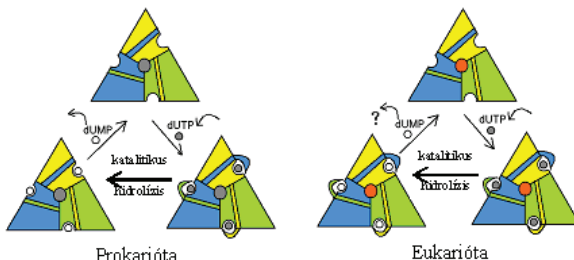
kötődésekor az aktív helyhez rendeződik, lezárván annak bejáratát (2.15. ábra), valamint az V. szekvenciamotívumbeli fenilalanin hidrofób ill. π - π kölcsönhatást létesít az uracilgyűrűvel (36, 46, 47). A C-terminális régió lokalizációja esszenciális a katalitikusan kompetens, zárt enzim konformer kialakulásához (33-35). Az alegységek közti ilyen nagyfokú kooperáció ismereteink szerint egyedülálló a homooligomer fehérjék körében. Az N-terminális szakaszok nagyobb változatosságot mutatnak, itt találhatóak a különböző lokalizációs szignálok.



2.15. ábra A fehérje alegységek konzervált motívumainak szerepe az aktív centrum kialakításában, és a szubsztrát megkötésében (A) Az öt konzervált szekvencia motívum a fehérje elsődleges szerkezetében. Az aktív centrumban az első alegység adja a β -hajtú kialakulásáért felelős III. konzervált szekvencia motívumot (sárga). A második alegység az I., II., és IV. motívummal járul hozzá a katalitikus centrum kialakulásához (zöld). A kizárólag szubsztrát bekötésekor rendeződő, az V. motívumot tartalmazó C-terminális kart a harmadik alegység biztosítja (kék). (B) A nem hidrolizálható α,β -imido dUTP szubsztrátanalóg (narancssárga pálcikamodell) kötődése a humán dUTPáz aktív zsebében (PDB kód: 2HQU) Az egyes aktív helyek felépítéséhez mindhárom alegység hozzájárul a megfelelő konzervált szekvencia motívumaival (A ábra). A dUTPáz megjelenített szakaszait szalagmodellel ábrázoltam, a szubsztrátkötésben szerepet játszó aminosavakat pálcikamodellel is megjelenítettem. Az A ábrán használt színek megfelelnek a B ábrán jelölt szekvenciamotívumokat tartalmazó peptidszakaszoknak. H-hidak: fekete szaggatott vonal, a Mg^{2+} rózsaszín, a víz piros gömb

A *Plasmodium falciparum* és az MPMV (Mason Pfizer Monkey Virus) dUTPázban a flexibilis C-terminális régió nem épül be a szomszédos alegység β -redőjébe, hanem visszakanyarodik a saját alegység fölé, és a *Plasmodium*-ban az N-terminális β -szállal (43), az MPMV-ben a saját alegység aktív centrumával létesít kölcsönhatásokat (45). Prokariótáknál mindenképp szükség van a

ligandum γ -foszfát csoportjára a C-terminális régió rendeződéséhez korábbi részletes szerkezet- és funkcióvizsgálat alapján (33), azonban egy nem publikált krisztallográfiai eredmény alapján eukariótákban a zárt konformer kialakul még dUMP szubsztrát jelenlétében is (v.ö. 36).



2.16. ábra A pro- és eukarióta dUTPázok katalitikus ciklusa: Az *E. coli* dUTPáz esetében a katalitikus reakcióhoz szükséges zárt aktiv centrum a hidrolízist követően kinyílik, lehetővé téve a termék távozását. A humán enzim megtartja a zárt konformációt a hidrolízist követően, így a termék távozása egyelőre nem tisztázott. A funkcionális eltérés oka feltehetően a trimer enzim alegységei közti eltérő kommunikációval magyarázható. A homotrimer dUTPáz alegységei sárga, kék és zöld színűek, a prokarióta enzim apoláros központi csatornája szürke színű, míg az eukarióta enzim poláros központi csatornája piros színű

Ez alapján eukariótáknál feltételezhető az alegységek közötti nagyfokú kölcsönhatás, kooperáció, allosztéria (34) (2.16.ábra). E kérdés tisztázására terveztük a mágneses magrezonancia kísérleteket, amelyeket kinetikai mérésekkel kívántunk alátámasztani.

A három alegységből létrejövő globuláris fehérje központi csatornája eltérő polaritású pro- és eukarióta szervezetekben. A prokariótáknál szorosabb pakoltság és apoláros oldalláncok jellemzőek (34), míg az eukariótáknál poláros oldalláncok, valamint a humán enzim kristályszerkezetében (36) egy szerkezetstabilizáló Mg^{2+} -ion a központi csatornában. A humán enzim szerkezetét alapul véve felépítettük a *D. melanogaster* homológiamodelljét. (szekvenciaazonosság: 65%). A megfelelő helyen szintén erősen konzervált poláros oldalláncok találhatóak. Ebből kiindulva próbáltam bizonyítani a szerkezeti Mg^{2+} -ion létét CD spektroszkópia segítségével. Ezen kívül mindhárom katalitikus helyen található Mg^{2+} -ion, mint kofaktor. Ennek, valamint a nukleofil támadó vízmolekulának helyét csoportunkból Barabás Orsolya azonosította (11). A fémion specificitás az enzim-szubsztrát komplex konformációjától várhatóan nagymértékben függ.

A dUTPáz részletes katalitikus mechanizmusának felderítését csoportunkból Barabás Orsolya végezte (11). Igazolta, hogy a nukleofil szubsztitúciós reakcióban a támadó ágens egy vízmolekula (a reakció kismértékű pH függését tekintve valószínűbb, mint a hidroxidion), valamint azonosította a vízmolekulát koordináló III. motívumbeli aszpartát-csoportot. Az AspIIIAsn mutáns

előállítva az enzim teljesen inaktívnak bizonyult, és röntgendiffrakciós szerkezetmeghatározás alapján bizonyítottan hiányzik a katalitikus vízmolekula, mivel az Asn csoport nem képes megfelelő koordinációs környezetet biztosítani. Egy svéd kutatócsoport már korábban valószínűsítette, hogy a támadás a deoxiuridin-trifoszfát ligandum α -foszforatomján megy végbe (52). ^{18}O -nel jelölt vízben végezve a kísérletet, a ^{18}O -t nem a pirofoszfáton, hanem a dUMP α -foszforatomján találták. A reakció asszociatív karakterére vonatkozólag szintén Barabás Orsolya szolgált perdöntő kísérleti bizonyítékkal, bár elméleti megfontolások alapján is ez volt valószínűsíthető, mivel a disszociatív mechanizmus esetében a nagy térigényű kovalens ligandumot tartalmazó metafoszfát jellegű intermedier rendkívül instabil lenne. Megfelelő kristályosítási körülményekkel, valamint egy megfelelően lassú enzimmel (MPMV dUTPáz) és egy nehezen hidrolizálható szubsztituenssel (α - β -imido-dUTP) elérte, hogy a fehérjekristályban látható élettartalmúvá vált a nagyenergiájú köztitermék, aminek szerkezetét röntgenkristallográfiás módszerrel határozta meg. A köztitermék a trigonális bipiramisos α -aminofoszforán-dUTPnek adódott, melyben az α -foszforatom öt kovalens kötést létesít (kézirat közlésre beküldve).

2.4. Célkitűzések és kísérletek racionális tervezése

A fenti megválaszolatlan kérdéseknek megfelelően három fő célt tűztünk ki:

- a szubsztrát és szubsztrátanalóg ligandumok kötődés hatásának vizsgálatát a dUTPáz flexibilis C-terminálisára, valamint az eukarióta dUTPázok kooperativitására vonatkozó feltételezések alátámasztását NMR spektroszkópiával és enzimkinetikai vizsgálatokkal
- a fémionoknak az enzim szerkezeti stabilitására és katalitikus működésére gyakorolt hatásának tanulmányozását enzimkinetikai módszerekkel és CD spektroszkópiával
- a pro- és eukarióta dUTPázok közti különbségek okainak tanulmányozását

Az NMR-es kísérletekhez elengedhetetlen a fehérjeminta nagy koncentrációja és tisztasága. Ennek érdekében minél töményebb oldat elérése volt a cél. A reakció gyorsasága miatt nem a dUTP szubsztrátot, hanem a sok nagyságrenddel lassabban hidrolizálható α,β -imido-dUTP-t használatát, valamint dUDP nem hidrolizálható ligandumot és dUMP terméket tartottuk megfelelőnek a titráláshoz. A nukleotid-foszfátok imido-analógjait az enzimológiában elterjedten használják, mert izosztérikusak, ugyanakkor az enzimek a P-N kötést a P-O kötésnél jóval nehezebben, vagy egyáltalán nem hidrolizálják.

A kooperativitásra vonatkozó feltételezéseinket az NMR spektroszkópián kívül enzimkinetikai vizsgálatokkal kívántam alátámasztani, amihez a szubsztráttelítési görbe felvételét tartottam megfelelőnek. Az alacsony szubsztrátkoncentrációk miatt ez a feladat nem kecsegtetett biztos sikerrel, de végül megbízható eredményt tudtam produkálni.

A fémionok katalízisre való hatásának tanulmányozásához többféle szempont szerint választottuk ki a megfelelő ionokat. Fontos szempont, hogy fiziológiás pH-n a fémion ne csapódjon ki az oldatból. Ez vonatkozott a szerkezetstabilizáló hatás vizsgálatára is.

3. Módszerek

3.1. Anyagok

3.1.1. Anyagok származása

Az α,β -imido-dUDP-t a Jena Biosciencetől vásároltuk, majd enzimatikusan α,β -imido-dUTP-vé foszforiláltuk. Ioncserés kromatográfiával vizsgálva a minta 98%-os tisztaságúnak mutatkozott. A ^{15}N -nel jelölt rekombináns *Drosophila melanogaster* dUTPáz előállításához M9 minimál médiumot használtam, ami $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -ot tartalmazott, melyet a kolozsvári National Institute of Research & Developement for Isotopic and Molecular Technologies-től rendeltünk. A sejtek növesztését még teljesen jelölt ^{15}N médiumban végeztem, amelyet Silantes GmbH-től (München, Németország) vásároltuk. A többi kísérletekhez fölhasznált analitikai tisztaságú vegyszer a Merck illetve a Sigma cégektől származott. A fehérjetisztításhoz Gradifrac rendszere (Amersham Bioscience) kötött ioncseres kromatográfiás oszlopot (Q-Sepharose, Pharmacia Biotech, Fast Flow)) és FPLC (fast protein liquid chromatography) rendszere kötött gélszűrő oszlopot (Superdex 200 HR) használtam.

3.1.2. Anyagok tisztaságának jellemzése

3.1.2.1. Induktív csatolású plazma atomemissziós spektroszkópia (ICP-AES)

A Perkin Elmer Optima 3200DV típusú CETAC technológiájú U5000AT+ típusú ultrahangos porlasztóval felszerelt ICP-AES készüléket használtuk az oldatok fémionmentességének vizsgálatához. Ellenőriztem az aktivitás- és a CD puffert, az enzim- és ligandumoldatokat, és a műszer detektálási küszöbe alattinak találtam a következő fémeket: Al(2 $\mu\text{g/l}$), As(2 $\mu\text{g/l}$), Ba(0.3 $\mu\text{g/l}$), Cd(0.2 $\mu\text{g/l}$), Co(0.5 $\mu\text{g/l}$), Cr(2 $\mu\text{g/l}$), Cu(1 $\mu\text{g/l}$), Fe(1 $\mu\text{g/l}$), K(400 $\mu\text{g/l}$), Mg(15 $\mu\text{g/l}$), Mn(1 $\mu\text{g/l}$), Mo(1 $\mu\text{g/l}$), Na(10 $\mu\text{g/l}$), Ni(2 $\mu\text{g/l}$), Pb(1 $\mu\text{g/l}$), Se(2 $\mu\text{g/l}$), Sn(1 $\mu\text{g/l}$), V(1 $\mu\text{g/l}$) és Zn(2 $\mu\text{g/l}$).

3.2. Fehérjetermelés, tisztítás

3.2.1. Expresszió

A fehérjét rekombináns módon baktériumokkal termeltettük, mivel így jó hatékonysággal

nagy tisztaságú enzimmintát nyerhetünk.

Az LD20050 plazmidról (Research Genetics, Inc.) a dUTPáz gént polimeráz láncreakcióban (PCR-ban) szaporították fel. A *Drosophila* genomban kódolt dUTPáz a C-terminális végén 28 aminosavból álló más dUTPázokkal hasonlóságot nem mutató peptidszegmenst tartalmaz. Ezért két *Drosophila* dUTPázt hoztak létre, egyik a teljes hosszúságú fehérjeszekvenciát kódoló LDdUTPáz (1-188), a másik a csak a *Drosophilára* jellemző extra 28 aminosavnyi C-terminális részt nélkülöző SDdUTPáz (1-161). Az így nyert két formát pET22b (Novagen) expressziós plazmidba vágták: Lddut-pET22b és Sddut-pET22b. A plazmidokat *E. coli* XL1-Blue-ban szaporítottuk és „Quiagene midi”szettel tisztítottuk. A plazmidokat *E. coli* BL21(DE3) törzsbe transzformáltuk elektroporálással. A transzformált törzset ampicillint tartalmazó LB (Luria-Bertani)-agar lemezeken egy éjszakán át 37 °C-on növesztettük, amit karbenicillint tartalmazó 500 ml LB tápoldatban rázatón növesztettünk tovább exponenciális növekedési fázisig (48). (A növekedést optikai denzitás (OD) mérésével követtük spektrofotometriásan 600 nm-en.) A ¹⁵N-nel jelölt LD dUTPáz előállításához az LB tápoldat helyett értelemszerűen ¹⁵N-nel jelölt komplett tápoldatot (Silantes), illetve ¹⁵ NH₄Cl-ot tartalmazó M9 minimál tápoldatot használtam. Ezután a sejteket 0,5 mmol izopropil-β-D-tiogalaktoziddal (IPTG) indukáltuk, további 5-6 órát növesztettük, végül 8000g-vel 10 percig 4°C-on lecentrifugáltuk, a sejtszapadékokat pedig -70 °C-on tároltuk foltárásig.

3.2.2. Tisztítás

A feltárást jégen végeztem. A lecentrifugált sejtszapadékokat 1:10 térfogatú feltárási pufferben szuszpendáltam, amely 50 mM Tris/HCl (aminometántriil-trimetanol/sósav) (pH=8)-t, 150mM NaCl-ot, 1 mM EDTA-t, 2 mM MgCl₂-ot, 1 mM ditio-treitol (DTT) és 0,5 mM fenil-metánszulfonil-fluoridot (PMSF) tartalmazott. 50 µg/ml lizozim és 1-1 µg/ml RNáz és DNáz hozzáadása után a sejtuszpenziókat 30 percig jégen kevertettem, majd 3*60 másodpercig szonikáltam, az elegyet további félórás kevertetés után lecentrifugáltam (18000g, 20 perc). A felülúszót 1 mM DTT-t és 0,1 mM PMSF-et tartalmazó 25 mM-os Na-foszfát pufferrel (pH=7.5) egyensúlyba hozott 200 ml Q-Sepharose anioncserélő oszlopon választottam el. A minta felvitele után 200 ml pufferrel mostam le az oszlopra nem, illetve gyengén kötődő mintakomponenseket, majd lineáris gradiens elúciót alkalmaztam 0-1 M NaCl közt 600 ml teljes térfogattal. A dUTPáz rendszerint 0,5-0,6 mM NaCl koncentrációnál eluálódott. Az ioncsere kromatográfia után a minta további tisztítására méretkizárásos kromatográfiát alkalmaztam Superdex 75 HR gélszűrő oszlopon Pharmacia FPLC berendezés használatával. A fehérjemintákat Millipore centrifugális szűrőkön (10 kDa pórusméret) töményítettem 8-15 mg/ml koncentrációig, amelyek folyékony N₂-ben lefagyaszta -70°C-on legalább 3 hónapig tárolhatók.

3.3. A fehérjeminta jellemzése

3.3.1. SDS gélelektroforézis

Na-dodecil-szulfátot tartalmazó poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) Laemmli szerint (49) 12%-os poliakrilamid mingéleken Protean III (Bio-Rad) berendezésen végeztem. A fehérjecsíkokat kolloidális Coomassie Brilliant Blue festéssel (Biosafe Coomassie stain, Bio-Rad) tettem láthatóvá, és Geldoc denzitométerrel (Bio-Rad) értékeltem ki. A tisztított fehérjeminták egyedüli látható csíkként jelentek meg a géleken, és a gélképek denzitometriás analízise alapján az így nyert enzimminták legalább 95 %-os tisztaságúaknak mutatkoztak.

3.3.2. Tömegspektrometria (MS)

Az NMR mérések előtt és után az enzimoldat stabilitását tömegspektrometrián ellenőriztük. Meg akartunk bizonyosodni afelől, hogy a flexibilis N-és C-terminális szakaszok az egész mérés folyamán jelen vannak, nem hasadnak le a dUTPázról. A spektrumot MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) (Reflex III Bruker) spektrométeren vettük föl. A MALDI-TOF kifejezetten nagy móltömegű, biológiai minták vizsgálatára, pontos móltömegmeghatározásra (± 1 -100 ppm) alkalmas, rendkívül érzékeny (10^{-20} mol) módszer.

A minták a tömegspektrometriás analízisre háromféleképpen lettek előkészítve:

- vízzel tízszeresére hígítva, 1 % trifluor-ecetsavat hozzáadva
- 0,1% trifluor-ecetsav tartalmú vízzel szemben dializálva
- C4 ZipTip (Millipore) oszlopon tisztítva (eluens: 0,1 % trifluor-ecetsav etanol:propanol 5:2 arányú elegyében)

A mérést mustársav mátrixban végezték. Lószív mioglobint használtak külső kalibrációnak. A spektrum pozitív lineáris módban készült késleltetett extrakcióval. A 150-200 lézer lövés eredményét összegezték. A molekulatömeget hét független mérés átlagából számoltuk. A tömegpontosság 0,1 %. A három különböző módon előkészített minta ugyanazt az eredményt szolgáltatta.

3.3.3. Koncentrációmeghatározás

A fehérjeminták koncentrációját Bradford-módszerrel (50), illetve az enzim ultraibolya

spektruma alapján határoztam meg.

A Bradford-módszer alapja, hogy a fehérjemintát olyan a fehérjéhez specifikusan kötődő festékanyaggal keverjük össze, amelynek molekulái szabad állapotukban másképpen nyelik el a fényt (barna), mint a fehérje lizin oldalláncaihoz kötődve (kék). Az 595 nm-en bekövetkező fényelnyelés-változás arányos a fehérjekoncentrációval. A módszer kalibrálására szarvasmarha szérumalbumint használtam.

A fehérjék UV spektrumában 280 nm-nél levő abszorpciós csúcs a fehérjében levő aromás oldalláncok π - π^* átmeneteiből származik. Így a fehérje aminosavösszetétele alapján kiszámítható az elméleti fajlagos extinkciós koefficiense ($\epsilon^{0,1\%}(1 \text{ cm}, 280 \text{ nm}) = 0.52$ (51), 0,32 illetve 0,26 *E. coli*, SD dUTPáz illetve LD dUTPáz esetében), amely az 1 mg/ml-es fehérjeoldat elnyelését adja meg. A spektrumokat minden esetben a fehérjét nem, viszont az oldat minden további komponensét tartalmazó pufferoldattal felvett alapvonallal korrigáltam. Így a fehérjeoldat ultraibolya spektrumában 280 nm-en észlelt korrigált fényelnyelésből a koncentrációt közvetlenül számítható volt.

3.3.4. Aktivitásmérés

A folyamatos aktivitásmérő módszer a teljes kinetika követésére, az enzim kinetikai jellemzésére, sebességi együtthatók számítására is alkalmas (33, 52). A dUTPáz által katalizált hidrolízis során H^+ ionok szabadulnak fel, aminek koncentrációváltozását steady-state körülmények között gyengén puffertolt közegben fenolvörös indikátor mellett 559 nm-en spektrofotometriásan folyamatosan követjük:



A rendszert enyhén puffertoljuk, hogy a mérés ideje alatt a pH-t a fenolvörös indikátor átcsapási tartományában tartsuk, így lehet optimális intenzitású detektálható jelet elérni. Az aktivitáspuffer: 1 mM TES-HCl, pH=7,5; 150 mM KCl, 40 μM fenolvörös, 5 mM MgCl_2 . A dUTP-t 40 μM -os, az enzimet 100-200 nM-os koncentrációban alkalmaztam. A méréseket 25°C-ra termosztálva, 10 mm-es úthosszú küvetében, JASCO-V550 spektrofotométeren végeztem üres küvetára nullázva, levegővel szemben, 0,2 másodpercenként rögzített abszorbanciaadatokkal. A kinetikai állandók meghatározásához az integrált Michaelis-Menten egyenletet használtam, az abszorbanciaváltozás görbéjének kezdeti meredekségéből meghatározva a kezdeti sebesség értékeket.

$$[\text{P}]_t / t = v_{\max} - K_M * \ln ([\text{S}]_0 / ([\text{S}]_0 - [\text{P}]_t)) / t$$

$$[\text{P}]_t = [\text{S}]_0 * (A_0 - A_t) / \Delta A_{\text{totál}}$$

$k_{\text{cat}} = v_{\max} / [\text{E}]_{\text{totál}}$, ahol P: termék, S: szubsztrát, E: enzim, A: abszorbancia, v_{\max} : maximális

sebesség, K_M : Michaelis állandó, k_{cat} : specifikus aktivitás

A kétértékű fémionokkal való szennyezés elkerülése végett a pufferoldatot Chelex gyantával kezeltem.

A szubsztráttelítési görbe felvételénél a fent leírt aktivitáspufferben a dUTP koncentrációját 0-40 μM -ig változtattam, az enzimkoncentráció 50 nM volt.

3.4. Szerkezetvizsgálat mágneses magrezonancia spektroszkópiával (NMR)

Az NMR mérésekhez az 1,75 mM koncentrációjú enzim mintákat a következő pufferrel szemben dializáltam: 81 mM nátrium-foszfát (pH=6,5), 5 mM MgCl_2 , 0,001% NaN_3 és 10% D_2O . Az SD és LD dUTPáz ^{15}N - ^1H HSQC (256 inkrementum az indirekt, és 4096 adatpont a direkt dimenzióban) és a 3D ^{15}N - ^1H HSQC-TOCSY és ^{15}N - ^1H HSQC-NOESY (2048 adatpont a direkt, 180 inkrementum az indirekt ^1H , és 64 az indirekt ^{15}N dimenzióban) spektrumait Bruker DRX 500 spektrométeren, $T=283\text{ K}$ -en vettük föl. A kétdimenziós HSQC, TOCSY, NOESY valamint a háromdimenziós HSQC-TOCSY és HSQC-TOCSY kísérletek ma már alap NMR módszernek számítanak (53). Először az apoenzimet mértük meg, majd a titrálást lépésenként 3-5 μl dUMP, dUDP és α,β -imido-dUTP hozzáadásával végeztük (16,7% - 33,3% - 66,7% - 100% telítettség eléréséig α,β -imido-dUTP esetében; 16,7% - 33% - 50% - 66,7% - 84% - 100% telítettség eléréséig dUDP esetében; valamint 10% - 20% - 30% - 50% - 60% - 80% - 100% telítettség eléréséig dUMP esetében). Minden titrálási lépésben 2D HSQC spektrum készült. A titrálás végén mindkét típusú 3D spektrumot újra fölvevük. A kiértékelés az XEASY és a SYBYL programokkal történt (54).

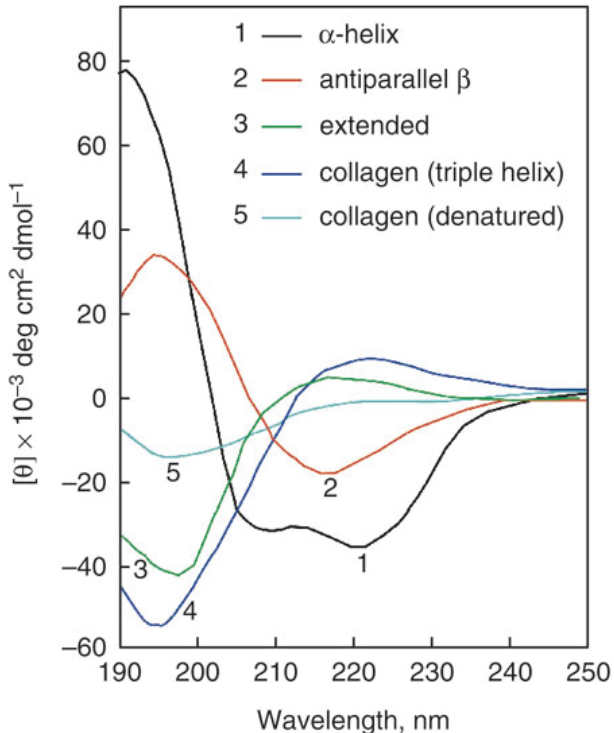
3.5. Szerkezetvizsgálat cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával (CD)

A CD spektroszkópia megfelelő és hatékony módszer királis molekulák szerkezetvizsgálatára.

A fehérjéket felépítő aminosavak a glicin kivételével királisak, viszont a fehérjék kromofor csoportjai, a peptidkötések és az aromás oldalláncok akirálisak. Az önmagukban akirális kromoforok fehérjén belüli aszimmetriájából is adódhat kiralitás, így a cirkuláris dikroizmus jelenségét megfigyelhetjük.

Az amidcsoportok jellemző elnyelése a távoli UV tartományba esik: 210-230 nm és 190-200 nm. A távoli UV tartományban felvett spektrumból dekonvolúciós módszerekkel megkaphatjuk a másodlagos szerkezeti elemek (α -hélix, β -redő, β - és γ -kanyarok) és a rendezetlen szerkezeti

elemek (random coil) arányát (3.1. ábra). Közei UV tarományban 280 nm-nél az aromás oldalláncoknak van jellegzetes elnyelésük, így azok egymáshoz viszonyított térbeli helyzetéről, vagyis a harmadlagos szerkezetről nyerhetünk információt.



3.1. ábra Fehérjék másodlagos szerkezeti elemeire jellemző CD spektrumok Az ábra az 55-ös referenciából származik.

A 200-250 nm tarományban felvett CD spektrumok a JASCO 720 spektropolariméteren 10 mm úthosszú küvetében Neslab RTE-111 számítógép kontrollált termosztáttal 25 °C-on készültek. A 10 μM koncentrációjú dUTPáz spektrumát 10 mM-os TES pufferben pH=7,5-ön vettem föl.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. A flexibilis C-terminális 5. motívumbeli nyolc aminosav azonosítása NMR spektroszkópiával (1. és 2. saját közlemények)

A ^{15}N izotóppal nem jelölt SD dUTPáz enzimmel előkísérleteket végeztünk, hogy ellenőrizzük, hogy az irodalmi adatok alapján (61) meghatározott fizikai körülmények megfelelőek-e, pl. meghatározott koncentrációnál kapunk-e értékelhető spektrumot, milyen a jeldiszperzió, jelszélesség stb. Ezért fölvtük a nem jelölt SD dUTPáz egydimenziós proton spektrumát. A széles háttérben az egyes régiók jelei fölismerhetők voltak:

alifás oldallánc-H: 0-3,9 ppm

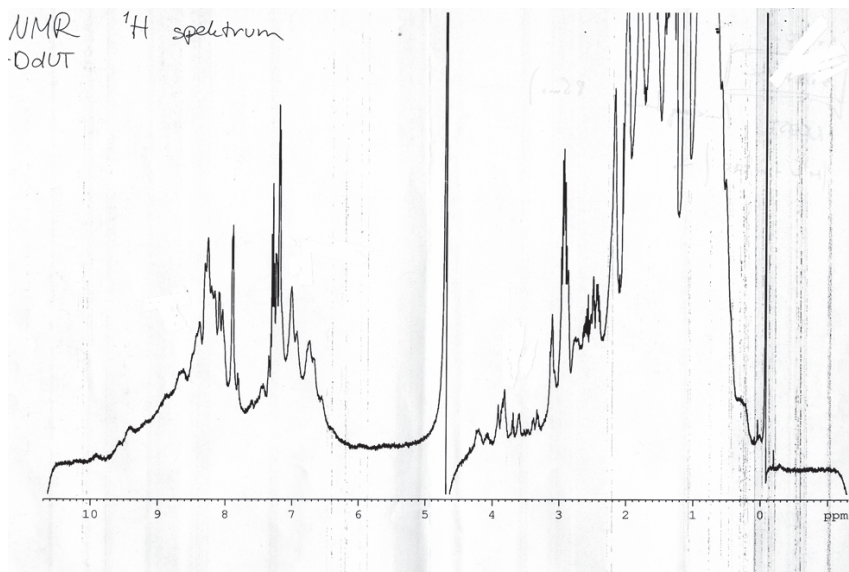
α -H: 3,9-4,7 ppm

aromás H: 6,5-7,5 ppm

oldallánc N-H: 6,5-7,5 ppm

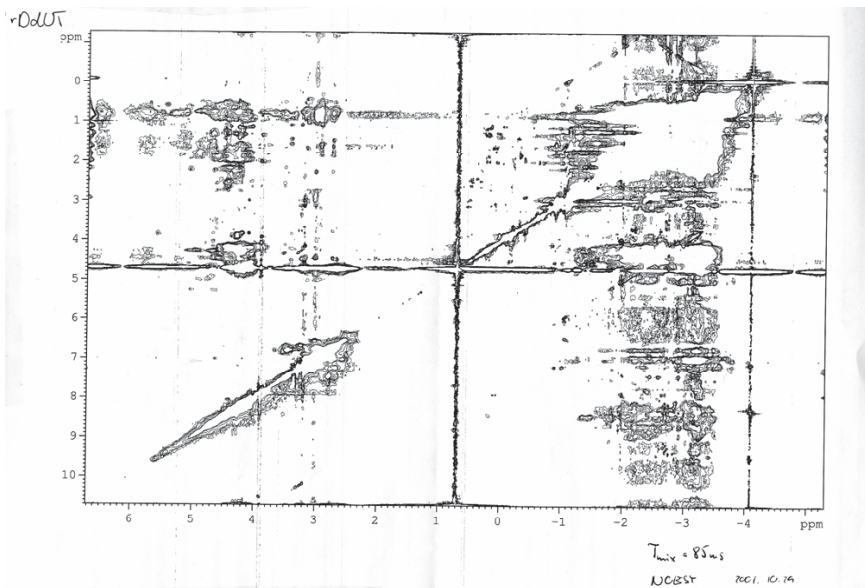
amid H: 7,5-10 ppm

(4.1. ábra).



4.1. ábra Az SD dUTPáz ^1H spektruma

Megmértük ugyanezen minta 2D NOESY spektrumát is, de a fehérje mérete miatt nem volt megfelelő a jeldiszperzió (4.2. ábra).



4.2. ábra Az SD dUTPáz NOESY spektruma ($t_{\text{mix}}=85$ ms)

Mérés után tömegspektrometriásan ellenőriztük a minta stabilitását. Degradáció nem volt megfigyelhető.

Mindenképpen szükséges a fehérje ^{15}N -nel való jelölése, hogy heteronukleáris (^{15}N - ^1H) korrelációkat, valamint hetero-homonukleáris 3D spektrumokat (^1H - ^{15}N HSQC-NOESY, ^1H - ^{15}N HSQC-TOCSY) tudjunk fölvenni.

Következő lépésként előállítottam a ^{15}N -nel jelölt SD és LD dUTPázt. Az egydimenziós ^1H spektrum után fölvtettük mindkét fehérje ^1H - ^{15}N HSQC spektrumát. Az LD dUTPáz (1-188) ^1H - ^{15}N HSQC spektrumában hozzávetőleg 50 éles jelet különítettünk el a széles háttértől, amely kiszélesedés oka a jól föltekeredett fehérjeglóbulum fő- és oldalláncbéli atomjainak kölcsönhatása okozta T_2 relaxációs idők csökkenése (56). Mivel készülékünk 500 MHz-es frekvenciájú, ennél a felbontásnál egy 60 kDa homotrimer enzim csak egy széles háttérként jelenhet meg, várakozásainknak megfelelően. Az éles jelek jelenléte azonban a fehérje bizonyos részeinek nagy konformációs szabadságát, flexibilitását bizonyítja. Ez az eredmény összhangban van a limitált tripszinolízissel azonosított flexibilis N- és C-terminális szegmensekkel. Az éles jelek száma megfelel a molekula flexibilis N- és C-terminális régiója aminosavszámának. Az SD dUTPáz ^1H -

^{15}N HSQC spektrumában 22 éles jelet találtunk, ez megfelel annak a ténynek, hogy ebből az enzimből hiányzik a csak a *Drosophilára* jellemző 28 aminosavas extra C-terminális szakasz. A kétféle dUTPáz stabilitását tömegspektrometriával ellenőriztük az NMR-es mérések előtt és után, a spektrumok között jelentős különbség nem volt látható, a fehérje degradációja nem volt detektálható.

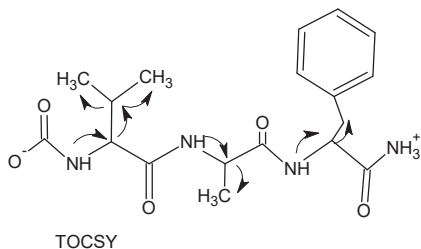
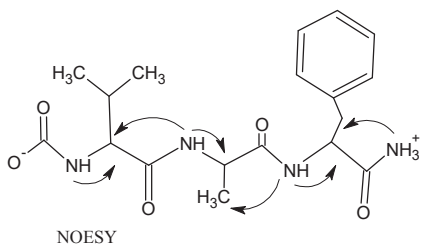
Háromdimenziós ^1H - ^{15}N HSQC-TOCSY és ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY spektrumokat vettünk fel a LD dUTPázra és a SD dUTPázra.

A következő kísérletben az LD dUTPázhoz α,β -imido-dUTP-t adtunk főlegesen, mely izoszterikus, ám sok nagyságrenddel lassabban hidrolizálható, mint a dUTP szubsztrát, azaz a kísérlet időtartama alatt nem hidrolizálódik (59, 60). A szubsztrátanalóg hozzáadására a HSQC spektrumból nyolc éles jel eltűnt. A dUDP nem hidrolizálható szubsztrátanalóg és dUMP termék hozzáadására a spektrumból szintén eltűnt a nyolc éles jel (4.3. ábra). Az asszignáció két lépésben történt. Első lépésben a ^1H - ^{15}N HSQC-TOCSY kísérletekből aminosav típus szerint azonosítottuk a jeleket, azaz adott NH protonnal (2D HSQC metszet) egy spinrendszerben levő protonokat kaptuk meg a 2D TOCSY metszetből. A prolinok nem látszanak a peptidkötésben levő nitrogénen levő hidrogén hiánya miatt, a glicinek $\alpha\text{-CH}_2$, az alaninok a $\beta\text{-CH}_3$ csoport miatt egyértelműen fölismerhetők, valamint elkülöníthetők az ún. J-típusú aminosavak, amelyeknél a $\gamma\text{-C}$ -atomon nincs hidrogén, és az U-típusú aminosavak, amelyeknél a spektrumban láthatóak a $\gamma\text{-C}$ -atomon lévő protonok (4.1.táblázat). Ezek száma típus szerint jó egyezést mutat a LD dUTPázban és a SD dUTPázban levő aminosav számmal.

Nincs NH	$\alpha\text{-CH}_2$	$\beta\text{-CH}_3$	J-típusú	U-típusú
Pro	Gly	Ala	Asp, Asn, Cys, His, Ser, Phe, Tyr, Trp	Arg, Gln, Glu, Ile, Leu, Lys, Met, Thr, Val

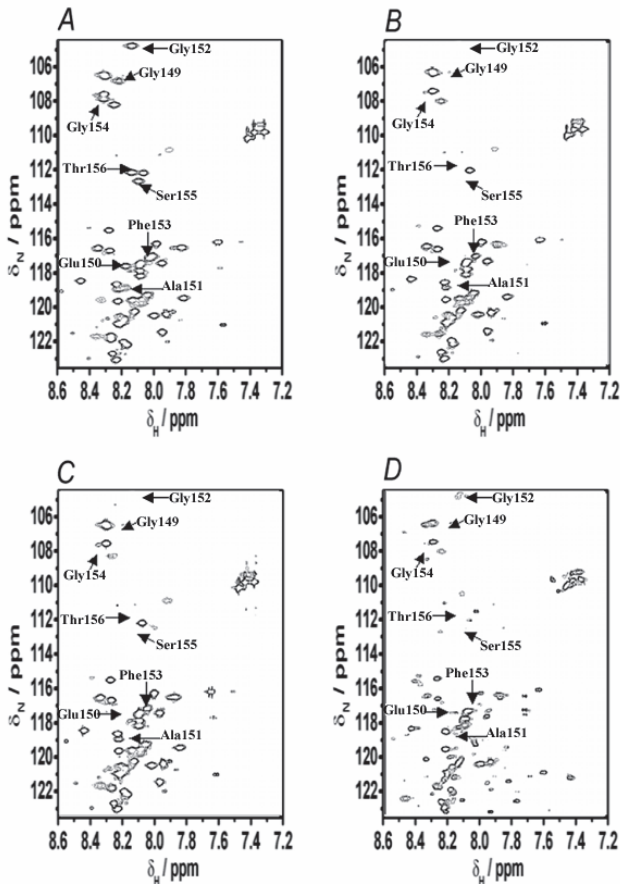
4.1. táblázat: Aminosavak típus szerint

A ^1H - ^{15}N HSQC-NOESY kísérletekből megállapítottuk az azonosított spinrendszerek konnektivitását oly módon, hogy adott aminosavban lévő NH proton térben közel van, így dipoláris relaxációval csatol saját $\text{C}_\alpha\text{-H}$ protonjával, valamint a láncban öt megelőző $\text{C}_\alpha\text{-H}$ protonjával, eképpen a láncon visszafelé haladva megállapítható az aminosav sorrend. Pl. 4.3 ábra:



4.3. ábra NOESY és TOCSY sematikus ábrázolás NOESY: Dipoláris csatolások az NH proton és a C α -H protonok között, TOCSY: Skaláris csatolások az NH proton és C α -H, C β -H, C γ -H stb. protonok között

Tehát a HSQC-TOCSY és HSQC-NOESY spektrumokból a jelek típusai és a konnektivitás alapján azonosított nyolc aminosavnyi szegmens: Gly-U-Ala-Gly-J-Gly-J-U csak a következő peptidszegmensre illik az acetmuslica dUTPázából: Gly¹⁴⁹-Glu-Ala-Gly-Phe-Gly-Ser-Thr, amely közvetlenül a szigorúan konzervált Arg¹⁴⁸ után helyezkedik el, a konzervált V. motívumban (4.4. ábra).



4.4. ábra A *D. melanogaster* dUTPáz ^1H - ^{15}N HSQC spektruma önmagában (A), valamint α,β -imido-dUTP (B), dUDP (C) és dUMP (D) szubsztrátokkal: A nyilak jelzik az enzim-ligandum komplexképződés hatására eltűnő csúcsok helyét

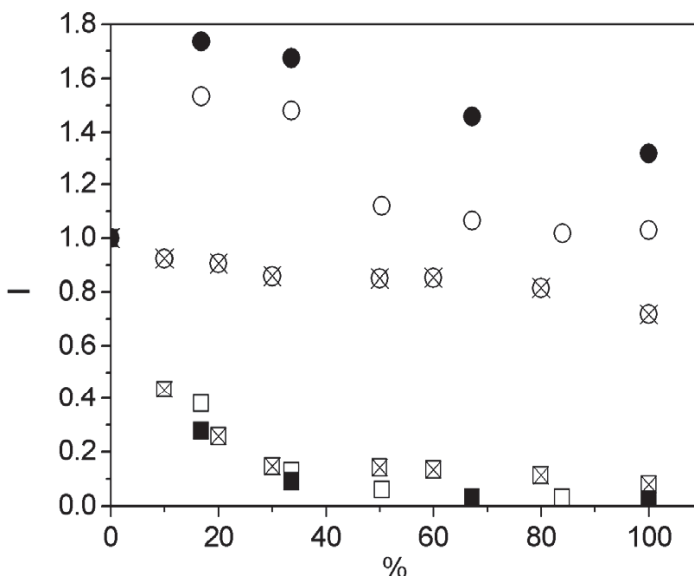
A többi éles jel megfelel a fennmaradó C-és N-terminális régióknak, egyértelmű azonosítás azonban nem volt lehetséges a nagyszámú prolin és alanin miatt, de a jelek száma és típusa összhangban van a szekvenciamotívumokkal, pl. a glicinek száma megegyezik, úgy, mint az U-típusú aminosavak száma.

Korábbi eredményekből (limitált tripszinolízis, röntgenszerkezetek (v.ö. 3) (57) tudjuk, hogy

a szubsztrát hatására a konzervált V. szekvenciamotívum rendeződik, a kar becsukódik az aktív hely fölé. Kísérleti eredményeink szerint a szubsztrátanalógok hozzáadására nyolc éles jel kiszélesedett, és beleolvadt a jól föltekeredett globuláris fehérje széles hátterébe. Összevetve korábbi flexibilitásra vonatkozó adatainkkal, az NMR eredmények valószínű értelmezése szerint eme nyolc aminosavnyi szegmens konformációs szabadsága nagymértékben csökkent, flexibilitása megszűnt, stabilizálódott, a fehérje globulummal megnőtt kölcsönhatása, tehát megerősíti a korábbi, más módszerrel kapott eredményeket. Érdekes módon ez a rendezett konformáció nemcsak a kevésbé hidrolizálható α,β -imido-dUTP hatására jött létre, hanem a termék dUMP hatására is. Ez az eredmény eltér a korábbi *E. coli* és retrovirális dUTPázokkal végzett kísérletek eredményétől, mert ott csak a trifoszfát analóg hozzáadására szélesedett ki néhány jel az NMR spektrumban (61). Ez az eredmény alátámasztja azt a feltételezést, miszerint a zárt enzim konformer csak eukarióta dUTPáz esetében van jelen az enzim-termék komplexben is. A kristályszerkezet alapján az 5. motívum egy fedelet képez a nukleotid felett a zárt konformerben. Mivel ez a konformer jelen adataink alapján jelen van az enzim-termék komplexben is, a termék távozásához valószínűleg szükség van a homotrimer összehangoltságára, az alegységek közti kommunikációra.

4.2. Titrálás nukleotidokkal (1. és 2. saját közlemények)

Mindhárom nukleotiddal titrálási görbét vettünk föl, amit NMR spektroszkópiával követtünk. Az enzimkoncentráció 1,75 mM volt, a látszólagos disszociációs állandók a dUTPáz-dUMP, dUTPáz-dUDP valamint a dUTPáz- α,β -imido-dUTPre: 21, 5 és 0,5 μ M (ez utolsó a dUTP Michaelis -állandója alapján becsült érték). Ez alapján minden titrálási lépésben a nem komplexált ligandum mennyisége 0,5 % alatti, tehát a komplexált enzim mennyisége durván megegyezik a hozzáadott ligandum mennyiségével. A titrálást több lépésben végeztük: 0% - 16,7% - 33,3% - 66,7% - 100% α,β -imido-dUTP esetében; 0% - 16,7% - 33% - 50% - 66,7% - 84% - 100% dUDP esetében; valamint 0% - 10% - 20% - 30% - 50% - 60% - 80% - 100% dUMP esetében. Mivel lineáris az összefüggés a rezonancia csúcsok alatti terület (integrálok) és a koncentráció között, ezért a csúcsok alatti területből a különböző konformerek aránya megállapítható. A titrálás alatt a nyolc éles csúcs intenzitása 10 % alá csökkent már 50%-os telítettségénél, sőt, már 33%-nál 10% körüli volt (4.5. ábra).



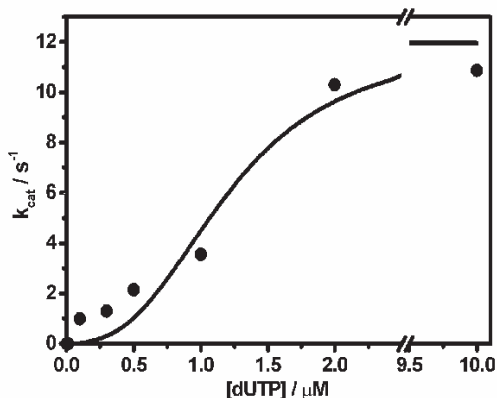
4.5. ábra A ^1H - ^{15}N HSQC csúcsok intenzitásváltozása a *D. melanogaster* dUTPáz nukleotidokkal való titrálása hatására: α,β -imido-dUTP (tömör szimbólumok), dUDP (lyukas szimbólumok) valamint dUMP (áthúzott szimbólumok) Ser¹⁵⁵: négyzet, egy Gly a 28 aminosavas *D. melanogaster* specifikus C-terminális karból: kör

A titrálási görbék egyik lehetséges értelmezése, hogy egy ligandum kötődésekor a másik két alegység C-terminálisa is rendeződik, becsukódik a kar. Ez az effektus mindhárom nukleotidnál egyformán megfigyelhető. Ez az eredmény szintén alátámasztja, hogy az alegységek nem függetlenek egymástól, kooperativitás van jelen.

Azon felül, hogy a szubsztrát hatására a nyolc éles jel eltűnt, a 28 aminosavból származó éles jelek intenzitása szignifikánsan megnőtt (4.5. ábra). Ám ez az intenzitásnövekedés csak a dUDP és az α,β -imido-dUTP hatására jött létre. Mivel ezt az intenzitásnövekedést okozhatja a konformációs szabadság, flexibilitás növekedése, feltételezhetjük, hogy a 28 aminosavas extra régióknak is van valami szabályozó szerepe a szubsztrátkötődésben illetve az enzimatis mechanizmusban.

4.3. Szubsztráttelítési görbe (1. és 2. saját közlemények)

Az alegységek közti kölcsönhatás, kommunikáció igazolására szubsztráttelítési görbét vettem föl a dUTP-vel. Az enzimatisz hidrolízist spektrofotometriásan követtem az aktivitásmérés korábban leírt módján. A 0,1 0,3 0,5 1 2 10 μM dUTP koncentrációval, 5-10 paralel mérés átlagából számított k_{cat} -ot ábrázoltam a dUTP koncentráció függvényében. A standard hiba 22% volt. Az így nyert szubsztráttelítési görbe szignifikáns eltérést mutat a hiperbolikus Michaelis-Menten kinetikától, így az allostérizus enzimeknél használatos Hill-egyenletet (62) illesztettem a szigmoid jellegű szubsztráttelítési görbére. Ha a Hill-koefficiens értéke 1, akkor nem beszélhetünk kooperativitásról, a görbe megegyezik a Michaelis-Menten hiperbolikus szubsztráttelítési görbéjével. Ha a Hill-koefficiens értéke nagyobb egynél, úgy az alegységek együttműködnek, kooperatívak. A Hill-koefficiens maximális értéke az alegységek száma, esetünkben 3. A láthatóan szigmoid görbére a Hill-egyenletet illesztve a paraméterek: átviteli szám: 12 s^{-1} , szubsztrát koncentráció félig telített állapotban: $1,2 \mu\text{M}$, a Hill-koefficiens 2,8-nak adódott, mely erős kooperativitásra utal (4.6. ábra).



4.6. ábra A *D. melanogaster* dUTPáz szubsztráttelítési görbéje: Az enzimatisz dUTP hidrolízis spektrofotometriásan követve: kezdeti sebesség adatok a dUTP koncentráció függvényében, 5-10 paralel mérés átlaga, standard hiba 22 %. Az adatpontokra a Hill-egyenletet illeszttem, Hill-koefficiens: 2,8 átviteli szám 12 s^{-1}

Eddig az irodalomban nem találunk utalást arra vonatkozólag, hogy bármely dUTPáz kooperatív lenne, sőt, némely cikk, mely prokarióta dUTPázok működési mechanizmusával foglalkozik, a kooperativitás teljes hiányát említi (52, 63). Ez az eltérés a prokarióta *E. coli* és az eukarióta *Drosophila* dUTPáz között eltérő evolúciós fejlettségükkel magyarázható. Ez a kisebb érzékenység az *E. coli* dUTPáznál abból eredhet, hogy az enterobaktériumoknál a pirimidin metabolizmusban a dUTP a dTTP bioszintézis prekursora (64). Az eukariótáknál a dUMP tölti be ezt a szerepet, mint a dCMP dezamináz terméke. Ez az enzim nincs jelen az enterobaktériumokban, csak a dCTP dezamináz, melynek terméke a dUTP. Sok példával igazolhatjuk, hogy az eukariótákban sokkal kifinomultabb az enzimatikus szabályozás, mint a prokariótákban (65-67).

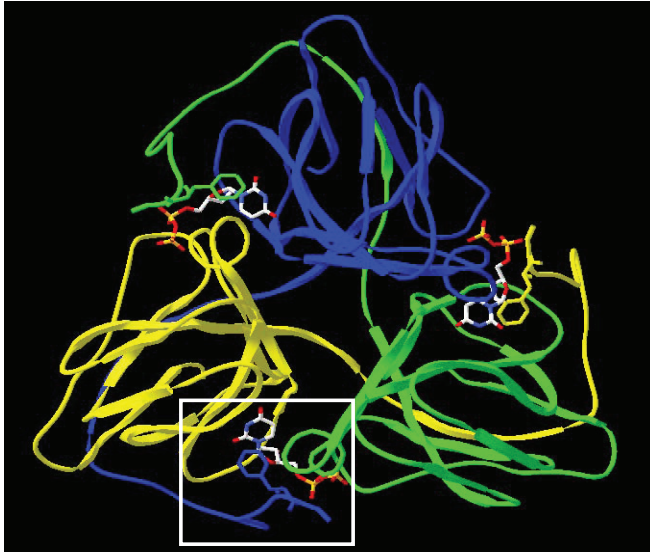
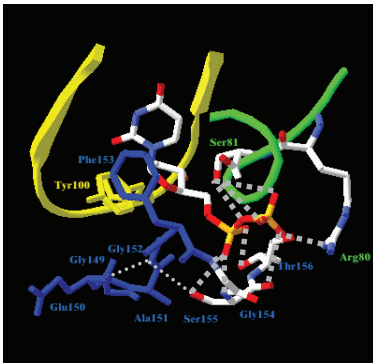
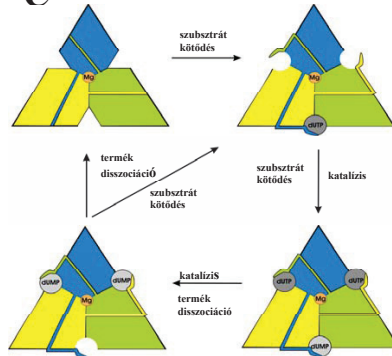
4.4. Szerkezeti modell (1. és 2. saját közlemények)

A többdimenziós NMR vizsgálatok alapján elmondható, hogy a konzervált V. motívum konformációja nagyon hasonló az enzim-dUMP és az enzim- α - β -imido-dUTP komplexben. Ennek a szegmensnek a szerkezeti modelljét a kristályszerkezetből ismert *E. coli* dUTPáz és korábban publikált *Drosophila* dUTPáz homológiamodell alapján készítettük el (4.7. A ábra). A két utolsó, nukleotid ligandum által perturbált aminosav (Ser¹⁵⁵ és Thr¹⁵⁶) nem lokalizálható a korábbi humán enzim kristályszerkezetében. Ezért energiainimalizálással szimuláltuk ezeknek helyzetét. A modellszerkezetet elemezve azt láthatjuk, hogy a Gly¹⁵²-Phe-Gly-Ser-Thr pentapeptid többszörösen kölcsönhat az α - β -imido-dUTP foszfátláncával (4.7. B ábra). A Ser és a Thr oldalláncán lévő hidroxil-csoport hidrogénkötéseket létesít a ligandum α -foszfátcsoportjával. Ezek a kölcsönhatások erősen meghatározóak lehetnek az 5. motívum rendeződése szempontjából, hiszen a dUMP-val is várhatóan ezek a kölcsönhatások alakulnak ki. Ráadásul még a főlánc karbonil oxigénje és amid nitrogénje is részt vesz a hidrogénhídban a foszfát oxigénekkal. Ezek a kölcsönhatások a fő-, oldalláncok és a ligandum között stabilizálják a foszfátlánc és a C-terminális szegmens elhelyezkedését, például egész hidrogénhíd hálózat alakul ki a Ser¹⁵⁶ oldallánc oxigénjétől a Gly¹⁵² főlánc nitrogénjén keresztül a Gly¹⁵¹ karbonil oxigénjéig. A Gly¹⁴⁹-Gly¹⁵² tetrapeptid kölcsönhatásba lép a szomszédos fehérjefelülettel, ezzel segítvén a C-terminális orientációját a ligandum foszfátlánca irányába.

A ligandum által indukált kooperatív konformációs változások alapján a katalitikus mechanizmus ciklusára a javaslatunk a következő (4.7. C ábra):

A három aktív helyből egy helyre kötődik egy szubsztrát, ez mindhárom aktív helyben konformációs változást okoz, ezzel megkönnyítvén újabb ligandumok kötődését. A kötés hasítása

nem okoz konformációs változást, az uracil, a dezoxiribóz és a foszfát hasonló környezetben van a katalízis előtt és után. A C-terminális régió hasonló rendeződése az enzim-dUTP és az enzim-dUMP komplexben azt jelenti, hogy ha a homotrimer részlegesen telített akár dUMP-vel akár dUTP-vel, kedvező egy következő szubsztrátmolekula kötődése. Fiziológiásan, a sejtben ez azért fontos, mert a dUTPáz felelős mind a dUMP mind a dUTP megfelelő koncentrációjáért, és a katalitikusan kompetens formában nagyobb valószínűséggel fordul elő. Másfelől feltételezhetjük, hogy a termék távozása a katalitikus helyről a szomszédos aktív helyen zajló katalitikus hasítással egybehangolt folyamat.

A**B****C**

4.7. ábra: A *D. melanogaster* dUTPáz nukleotid indukált konformációs változásainak szerkezeti modellje A: A homotrimer enzím teljes modellje Az ecetmuslica dUTPáz homológiamodellje szalagmodelllel ábrázolva, a 3 alegység különböző színekben A dUDP ligandum pálcikamodelllel ábrázolva (atomok színei: C-fehér, O-piros, N-kék és P-narancs); A C-terminális motívumbeli konzervált fenilalanin oldallánc átlapol az uracilgyűrűvel A modell nem tartalmazza az ecetmuslica-specifikus N- és C-terminális szakaszt; A fehér négyzet kiemeli a B ábrán bemutatásra kerülő szegmenst. B: A katalitikus hely zárt konformerje Színek, mint A ábrán; C-terminális Gly¹⁴⁹-Thr¹⁵⁶ oktapeptid (kék); β -hajtű, mely a deoxiribózt koordináló tirozint tartalmazza (sárga); valamint a foszfátlánc megkötésért felelős szegmens a 3. alegységből (zöld); Ser¹⁵⁵ és Thr¹⁵⁶ a Syblyel modellezve; H-kötések: pontozott vonal; C: A katalitikus ciklus sematikus ábrázolva, színek, mint A ábrán; dUTP sötét-, dUMP világosszürke kör, narancssárga kör: szerkezeti Mg²⁺

A 4.2. táblázatban részletezem az aminosav fő- és oldalláncok és a ligandum közötti kölcsönhatásokat az *ecetmuslica* dUTPázban:

	Aminosav	Ligandumrész (dUPNPP)	Kölcsönhatási távolság (Å)
C-terminális, V. motívum			
Arg(V)	Arg149 N η 1	Dezoxiribóz O3'	3,03
	Arg149 N η 1	γ -foszfát O γ 1	3,22
	Arg149 N η 1	γ -foszfát O γ 2	3,00
Gly(V)	Gly153 C α	Dezoxiribóz C4	3,50
Phe(V)	Phe154 amid N	β -foszfát O3 β	2,72
Gly(V)	Gly155 karbonil O	β -foszfát O1 β	3,07
	Gly155 karbonil O	β -foszfát O2 β	2,82
	Gly155 amid N	β -foszfát O2 β	2,63
Ser(V)	Ser156 karbonil O	γ -foszfát O1 γ	2,78
	Ser156 karbonil O	γ -foszfát O2 γ	2,91
	Ser156 amid N	γ -foszfát O1 γ	2,73
Thr(V)	Thr157 amid N	β -foszfát O1 β	3,01
	Thr157 O γ 1	α -foszfát O1 α	2,95
	Thr157 O γ 1	β -foszfát O1 β	2,63
Hélix, II. És IV. motívum			
Gln(IV)	Gln127 N ϵ 2	α -foszfát O2 α	2,99
Ser(II)	Ser82 O γ	α -foszfát N3 α	2,87
β -hajtú, III. motívum			
Gly(III)	Gly93 karbonil O	Uracil O4	3,41
Ala(III)	Ala94 C β	Uracil C5	3,44
Gly(III)	Gly95 amid N	Uracil O4	2,85
Val(III)	Val96 amid N	Uracil C5	3,37
	Val96 karbonil O	Dezoxiribóz O5'	3,24
Val(III)	Val97 C α	Dezoxiribóz C3'	3,45
Asp(III)	Asp98 carboxyl O δ 2	Dezoxiribóz O3'	2,87
Tyr(III)	Tyr101 C γ	Dezoxiribóz O3'	3,02
Gly(III)	Gly106 karbonil O	Uracil N3	2,90
	Gly106 karbonil O	Uracil O4	2,85

4.2. táblázat A dUPNPP szubsztrátanalóg és a (*D.melanogaster* dUTPáz) aminosav oldalláncok közötti kölcsönhatások Az *ecetmuslica* dUTPáz modellezett szerkezete a humán dUTPáz röntgenszerkezete alapján. A S156 és T157 oldalláncok konformációját Sybyl programmal illetve modelleztük

A következő táblázatból láthatjuk, hogy a becsukódó C-terminális kart hogyan stabilizálják a másik két alegység aminosav fő- és oldalláncai az *ecetmuslica* dUTPázban:

Aminosav a C-terminális karból	Aminosav másik alegységből	Kölcsönhatási távolság (Å)
Pro136 C γ	Pro71 C γ	3,37
Gln137 karbonil O	Leu22 amid N	2,68
Val139 amid N	Leu22 karbonil O	2,84
Val139 karbonil O	Phe24 amid N	2,82
Val141 amid N	Phe24 karbonil O	2,71
Leu144 C γ	Arg23 N η 2	3,44
Glu145 karbonil O	Gln69 N ϵ 2	3,21
Glu145 karbonil O	Arg102 N ϵ	2,78
Thr147 O γ 1	Asp100 karbonil O	2,74
Arg149 N ϵ	Asp100 O δ 1	2,98
Arg149 N η 1	Asp98 O δ 2	3,35
Arg149 N η 2	Asp98 O δ 1	3,09
Arg149 N η 2	Ser38 O γ	3,05
Phe154 amid N	Ser82 O γ	3,16
Phe154 C δ 1	Val86 C γ 2	3,22
Phe154 C δ 1	Gly83 amid N	3,46
Phe154 C ϵ 1	Val86 C γ 2	3,14
Thr157 karbonil O	Asp45 O δ 2	2,97
Thr157 karbonil O	Arg124 N η 2	2,88
Thr157 O γ 1	Arg81 N η 1	3,22
Thr157 C γ	Gln127 O ϵ 1	3,48

4.3. táblázat A C-terminális kar és a másik két alegység aminosav oldalláncainak kölcsönhatása (D. melanogaster dUTPáz) Az ecetmuslica dUTPáz modellezett szerkezete a humán dUTPáz röntgenszerkezete alapján

Összehasonlításképpen a következő táblázatból láthatjuk az aminosav fő- és oldalláncok és a ligandum közötti kölcsönhatásokat a humán dUTPázban:

	Aminosav	Ligandumrész (dUPNPP)	Kölcsönhatási távolság (Å)
C-terminális, V. motívum			
Arg(V)	Arg153 NH2	γ -foszfát O γ 3	2,90
	Arg153 NH1	γ -foszfát O γ 2	2,81
	Arg153 NH2	γ -foszfát O γ 2	3,43
Gly(V)	Gly159 amid N	β -foszfát O3 β	2,94
	Gly159 amid N	β -foszfát O2 β	3,07
Ser(V)	Ser160 amid N	γ -foszfát O γ 3	3,18
	Ser160 O γ	γ -foszfát O γ 3	2,57
Thr(V)	Thr157 amid N	γ -foszfát O1 γ	2,74
	Thr157 O γ 1	γ -foszfát O1 γ	2,63
Hélix, II. motívum, IV. motívum			
Gln(IV)	Gln131 N ϵ 2	α -foszfát O2 α	2,83
Gly(II)	Gly87 amid N	β -foszfát O2 β	2,75
Ser(II)	Ser86 O γ	α -foszfát N3 α	2,71
	Ser86 O γ	Dezoxiribóz O5'	3,42
	Ser86 O γ	Dezoxiribóz O4'	3,52
	Ser86 amid N	β -foszfát O2 β	3,22
Arg(II)	Arg85 NH2	γ -foszfát O1 γ	3,07
	Arg85 NH2	β -foszfát O1 β	3,12
	Arg85 N ϵ	β -foszfát O1 β	2,78
β -hajtó, III. motívum			
Gly(III)	Gly110 karbonil O	Uracil O4	3,37
	Gly110 karbonil O	Uracil N3	2,65
	Gly110 amid N	Uracil O2	3,17
Asp(III)	Asp102 O δ 1	Dezoxiribóz O3'	2,61
	Asp102 amid N	Dezoxiribóz O3'	3,04
Gly(III)	Gly 99 amid N	Uracil O4	2,73

4.4. táblázat A dUPNPP szubsztrátanalóg és a humán dUTPáz aminosav oldalláncai közötti kölcsönhatások A humán dUTPáz röntgenszerkezete (3EHW PDB) alapján

Végül összehasonlításképpen következő táblázatból láthatjuk, hogy a becsukódó C-terminális kart hogyan stabilizálják a másik két alegység aminosav fő- és oldalláncai a humán dUTPázban:

Aminosav a C-terminális karból	Aminosav másik alegységből	Kölcsönhatási távolság (Å)
Arg153 Nε	Asp104 Oδ1	3,45
Arg153 Nε	Ser42 Oγ	3,11
Arg153 NH1	Ser42 Oγ	3,45
Gly154 karbonil O	Arg106 amid N	2,77
Gly154 amid N	Thr151 Oγ1	2,86
Phe158 karbonil O	Lys91 Nζ	3,42
Phe158 amid N	Gly83 amid N	3,09
Thr157 karbonil O	Arg128 NH1	2,76
Thr157 Oγ1	Arg128 NH2	2,92
Thr157 Oγ1	Arg85 NH2	3,26
Gly162 karbonil O	Arg85 NH1	2,98
Gly162 karbonil O	Arg85 NH2	2,81
Lys163 karbonil O	Arg128 amid N	2,84
Asn 164 Oζ	Arg128 NH1	2,90
Asn 164 Oζ	Arg128 Nε	2,79

4.5. táblázat A C-terminális kar és a másik két alegység aminosav oldalláncainak kölcsönhatása a humán dUTPázban. A humán dUTPáz röntgenszerkezete (3EHW PDB) alapján

A táblázatbeli értékek összehasonlítása jól mutatja, hogy a szekvenciálisan konzervált oldalláncok az esetek túlnyomó többségében ugyanazt a funkcionális szerepet töltik be a humán és az ecetmuslica dUTPázban.

4.5. Fémionok szerepe a katalízisben (3. saját közlemény)

A fémion specificitás várakozásaink szerint nagymértékben függ az enzim-szubsztrát komplex szerkezetétől. Ennek a specificitásnak a kutatása új távlatokat nyithat az aktív hely szerkezetének és a különböző fejlődési útvonalak katalitikus mechanizmusa különbségeinek felderítésében.

Munkámban a szerkezeti és a katalitikus Mg^{2+} iont helyettesítettem különféle szempontok szerint csoportosított kétértékű fémionokkal, a katalízis alatt és nukleotid hiányában is. A fémionokat (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} és Zn^{2+}) különféle fizikai-kémiai tulajdonságok alapján választottam ki, úgy, mint ionsugár, elektronegativitás, koordinációs szám és fő- illetve mellékcsoport. A kinetikai paraméterekre valamint az enzim konformációjára gyakorolt hatást spektrofotometriás enzimaktivitás méréssel illetve cirkuláris dikroizmus spektroszkópiával követtem. Méréseim alapján az *E. coli* és az *acetmuslica* dUTPáz esetében a fémion specificitásban jelentős különbségek adódtak mind a katalízisben, mind a fehérjekonformációra gyakorolt hatásban, ráadásul a Ca^{2+} ion jelentősen csökkentette a *D. melanogaster* dUTPáz k_{cat} -ját.

4.5.1. Kinetikai tulajdonságok

A bakteriális és *acetmuslica* dUTPáz kinetikai paramétereit kétértékű fémionok jelenlétében és hiányában is meghatároztam. A többféle szempont szerint kiválasztott kétértékű fémionok - mint kofaktorok - dUTPáz katalízisre való hatását vizsgáltam (4.6. táblázat).

Fémion	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / 10^{-6}M$	$k_{cat} / K_M / 10^{-6}M^{-1}s^{-1}$	r_{ion} / pm (koordinációs szám)	Preferált és egyéb koordinációs szám
-	7,9±2	5,6±2	1,4±1	-	-
1 mM Mg^{2+}	15±1	1,1±0,4	14±1	86(6)	6, 4,8
1 mM Co^{2+}	14±0,3	0,79±0,4	16±6	79 _{isp} /89 _{hsp} (6)	6, 4,8
1 mM Mn^{2+}	11±2	0,73±0,3	15±2	81 _{isp} /97 _{hsp} (6)	6,4,8
1 mM Ni^{2+}	13±2	1,2±0,2	11±1	83(6)	6,4
1 mM Zn^{2+}	7,1±0,6	3,0±0,8	2,5±1	88(6) 74(4)	6,4,5,8
1 mM Ca^{2+}	0,78±0,3	1,5±0,5	0,52±0,2	(7) 126(8) 114(6)	7,8,6
1 mM Ba^{2+}	8,1±2	11±2	0,74±0,2	156(8)	8,6
1 mM Sr^{2+}	7,4±1	17±1	0,44±0,1	140(8)	8,6

4.6. táblázat Az SD dUTPáz kinetikai paramétereit kétértékű fémionokkal

Érdekes módon a *D. melanogaster* dUTPáz szignifikáns aktivitást mutat fémion hiányában is. Ez az eredmény alátámasztja az *E. coli* dUTPáz kinetikai állandóinak korábban publikált eredményeit (51), mely szerint a dUTPázok körében általános ez a fémion hatására bekövetkező viszonylag kis effektus.

Az eredmények alapján a fémionokat három csoportba soroltam. Az I. csoportba azok a fémionok kerültek, melyek mind a k_{cat} növelése, mind a K_M csökkentése szempontjából a Mg^{2+} -hoz hasonlóan viselkedtek. Ebben a csoportban a Co^{2+} , a Mn^{2+} és a Ni^{2+} ion található. Ezek mind koordinációs szám, mind ionsugár tekintetében nagyon hasonlóak a magnéziumionhoz. Például a mangánion több másfajta enzimatis rendszerben is használatos a Mg^{2+} helyettesítésére (73). Ez az információ a Mg^{2+} -iont helyettesítő d-fémionokról nagyon hasznos pl. röntgenkristallográfiában, ugyanis ott a jobb felbontás, és pontosabb szerkezeti információ érdekében a magnéziumiont vízhez hasonló elektronsűrűsége miatt ajánlatos nehéz atomokkal helyettesíteni. A II. csoportba csak a Zn^{2+} sorolható, amely nincs hatással a katalízisre. Cinkion jelenlétében a kinetikai paraméterek megegyeznek a fémion hiányában mért értékekkel. A III. csoportba az alkáliföldfémek tartoznak, természetesen a magnéziumion kivételével. Mindhárom ion: Ca^{2+} , Sr^{2+} és a Ba^{2+} csökkenti a k_{cat}/K_M kinetikai hatékonyságot a fémionmentes reakcióhoz képest. Az adatokat tüzetesebben megvizsgálván láthatjuk, hogy a Ca^{2+} a többitől eltérően viselkedett, a k_{cat} értéket tizedére csökkentette, míg egyidejűleg a K_M -et is csökkentette a magnéziumion mellett mért értékhez képest. Másrészt a stroncium- és a báriumion nincs hatással a k_{cat} -ra, míg a K_M -et megnövelte. Ez utóbbi valószínűleg a magnéziumionhoz képest nagyobb méretűnek és megnövekedett koordinációs számuknak köszönhető. A Sr^{2+} ion nagyobb mérete miatt torzulás lép fel az enzim-szubsztrát komplexben, mint ahogy ezt az EIAV dUTPáz- Sr^{2+} -dUDP komplex szerkezeténél már megállapították (38). A Ca^{2+} ion hatása a k_{cat} -ra és K_M -re a következőképpen magyarázható: Az alacsony K_M kedvező kölcsönhatást jelent a szubsztráttal, mint ahogy ez a Mg^{2+} ion jelenlétében is látható, viszont a k_{cat} csökkenése Ca^{2+} jelenlétében a katalitikus kompetencia nagymértékű csökkenésére utal. Mivel az elektronegativitás a $Mg^{2+} > Ca^{2+} > Sr^{2+} > Ba^{2+}$ sorrendben csökken, ez nem ad magyarázatot a kalciumion többiekétől eltérő viselkedésére. Viszont a Ca^{2+} -nak legkedvezőbb 7-es koordinációs szám már okozhat olyan szerkezeti torzulást, amely ilyen hatással van a katalízisre. A toxikus nehézfémion, a higany teljesen blokkolja az enzimaktivitást, valószínűleg kötődése jelentősen megváltoztatja az enzim szerkezetét.

Ugyanezeket a kinetikai méréseket elvégeztem az *E. coli* dUTPázzal (4.7. táblázat).

Fémion	k_{cat} / s^{-1}	$K_M / 10^{-6}M$	$k_{cat} / K_M / 10^{-6}M^{-1}s^{-1}$
-	$8,0 \pm 1$	10 ± 3	$0,84 \pm 0,3$
1 mM Mg^{2+}	11 ± 1	$0,62 \pm 0,3$	13 ± 1
1 mM Ca^{2+}	$3,4 \pm 2$	$5,0 \pm 0,3$	$0,66 \pm 0,3$
1 mM Sr^{2+}	$5,9 \pm 2$	11 ± 2	$0,54 \pm 0,2$
1 mM Ba^{2+}	$6,7 \pm 1$	12 ± 2	$0,58 \pm 0,2$

4.7. táblázat Az *E. coli* dUTPáz kinetikai paraméterei kétértékű fémionokkal

A kétértékű ionok okozta hatás többé-kevésbé hasonló, mint a *D. melanogaster* esetében. A fémionokat ugyanazokba a csoportokba sorolhatjuk be. Az első csoportba tartoznak a magnéziumiont a katalízis során hatékonyan helyettesítő ionok: Mn^{2+} , Co^{2+} és Ni^{2+} . Ezeket szintén használhatjuk röntgendiffrakciós mérésekhez a Mg^{2+} iont helyettesítő nehézatommként. A második csoportba itt is a cinkion tartozik, mely nincs hatással sem a specifikus aktivitásra (k_{cat}), sem a Michaelis- állandóra (K_M). A harmadik csoport szintén az alkáliföldfémeket tartalmazza a magnéziumion kivételével. A III. csoportban a k_{cat}/K_M nagyon hasonlóan adódott, mint a fémionmentes esetben. A *D. melanogaster* dUTPázal ellentétben a Ca^{2+} -nak itt sokkal kisebb a gátló hatása a katalízisre, az ecetmuslica dUTPázának specifikus aktivitását a kalciumion tizedére, míg a kólibaktérium dUTPázát felére csökkentette (4.8. táblázat). Eukarióta dUTPázoknál korábban is tapasztaltak hasonló gátló hatást (humán (36), patkánymáj (70)).

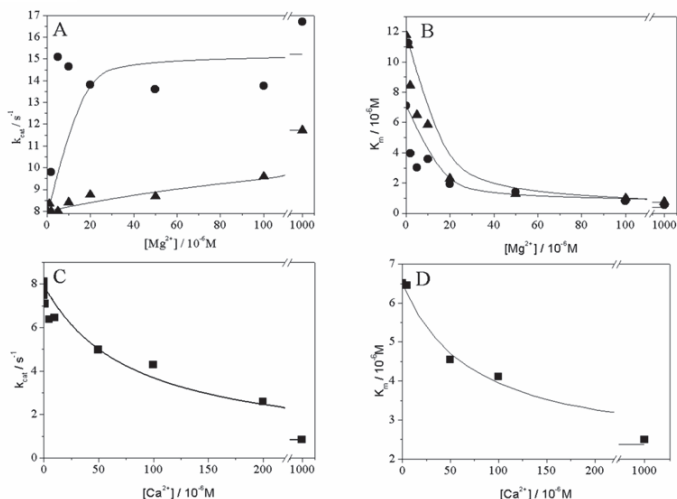
Aktivitás %-os változása				
	<i>E.coli</i> dUTPáz	SD dUTPáz	LD dUTPáz	MPMV-NC dUTPáz
-	61	56	50	54
Mg^{2+}	100	100	100	100
Ca^{2+}	31	5,7	11	43

4.8. táblázat Relatív aktivitásváltozás kalciumion hatására (magnéziumionnal való aktivitást véve 100%-nak)

Összehasonlításképpen megvizsgáltam, van-e gátló hatása a Ca^{2+} -ionnak az MPMV-NC dUTPázra. A 4.8. táblázatban látható, hogy nem szignifikáns az effektus, enyhe gátló hatást mértem.

A kalcium ecetmuslica és az *E. coli* dUTPázra való hatásának mélyebb megértése érdekében további titrálások kísérleteket végeztem (4.8. ábra). A magnézium általi aktivációt szintén a fenolvörös aktivitásméréssel vizsgáltam. Az enzim-szubsztrát- Mg^{2+} komplex látszólagos disszociációs állandóját a k_{cat} görbéből számoltam, ez $2,9 \pm 1,5 \mu M$ a *D. melanogaster* és $205 \pm 41 \mu M$ az *E. coli* fehérje komplexre. A specifikus aktivitás görbéin jól látható, hogy míg az eukarióta enzim esetében a szubsztráthoz képest tizedannyi moláris koncentrációban adott Mg^{2+} már telítést

jelent, a prokariótánál a fémiont feleslegben kell alkalmazni. Ez az affinitáskülönbség az evolúció eltérő fokán levő enzimek között származhat az *ecetmuslica* dUTPáz központi csatornájában lévő Mg^{2+} kötőhelytől. A szerkezeti magnéziumion konformációs változásokat hozhat létre az enzimen, mellyel megváltoznak annak katalitikus tulajdonságai. Másfelől a K_M értékek magnéziumfüggése nagyon hasonló mindkét enzimnél.



4.8. ábra: A Mg^{2+} és a Ca^{2+} hatása az *E. coli* és a *D. melanogaster* dUTPáz kinetikai állandóira (A), (B): A k_{cat} és a K_M értékek $[Mg^{2+}]$ függése *D. melanogaster* (●) és *E. coli* (▲) dUTPázra. (C), (D): A k_{cat} és a K_M értékek $[Ca^{2+}]$ függése *D. melanogaster* dUTPázra (■). dUTPáz koncentrációja 176 nM. A mért adatokat a módosított Hill egyenletre illeszttem ($y = (k_{cat} \cdot x^n) / (x^n + K_d^n)$), (vonal); (x a Mg^{2+} koncentrációja az A, B ábrán, és a Ca^{2+} koncentrációja a C, D ábrán, értelemszerűen. A k_{cat} a specifikus aktivitás, n a Hill koefficiens)

A kalcium gátló hatásának szélesebbkörű feltérképezése érdekében az eukarióta enzim katalitikus hatékonyságának kalcium koncentrációfüggését is vizsgáltam (4.9. táblázat). A kinetikai paraméterek kalciumion függése a 4.8. ábra C és D részén látható. Az enzim-szubsztrát- Ca^{2+} komplex látszólagos disszociációs állandója a k_{cat} görbéből $81 \pm 21 \mu M$ -nak, a K_M görbéből $74 \pm 13 \mu M$ -nak adódott. A kalciumion képes helyettesíteni a magnéziumiont a nukleotid ligandumkötő helyen, jöllehet az enzim Mg^{2+} -hoz való affinitása legalább egy nagyságrenddel nagyobb.

A *D. melanogaster* enzim *E. coli* dUTPázhoz viszonyított láthatóan nagyobb affinitása a Mg^{2+} irányában jelzi a két enzim fémkötő tulajdonságai közti jelentős különbséget, mely az evolúció során fejlődött ki.

Az eredmények arra utalnak, hogy az egyre fejlettebb evolúciós szinten levő dUTPázokat egyre jobban gátolja a kalciumion, egyre fontosabb regulációs szerepet tölthet be. Mint tudjuk, a Ca^{2+} jelentős szerepet tölt be a sejtbeli folyamatokban. Egy egészséges élő sejtben a kalciumion szintje 0,01 - 0,2 μM (68). Ingerület hatására megnő a kalciumkoncentráció, ennek fontos szerepe van az izomösszehúzódásban. Egy egészséges sejtben ingerület, stressz hatására a teljes kalciumionkoncentráció több mint 10 mM-ra nő, ám a szabad ion ennél jóval kevesebb az ún. nagy affinitású Ca^{2+} kötő fehérjék miatt, pl. egy molekula kalszekvesztrin 43 kalciumiont képes megkötni. A kalciumion koncentrációnövekedés a citoszolban indukálja a kalmodulinhoz való kötődést, a Ca^{2+} ATPáz allosztérikusán aktiválódik, a kalciumion sejtől való exportja főlgyorsul, amíg el nem éri a 0,1 μM alapkonzentrációt. Az energiatermelő folyamatokban is regulációs szerepet tölt be, hiszen a Ca^{2+} Mg^{2+} jelenlétében aktiválja az ATPázt. Szintén meghatározó a kalciumion jelenléte a programozott sejthalálban, az apoptózisban, melynek folyamán a kalciumion koncentráció több nagyságrenddel megnövekszik az ionpumpák meghibásodása folytán. Több, igen fontos enzimet szintén gátol a Ca^{2+} (69-72), köztük a programozott sejthalálban központi szerepet betöltőket (75), illetve aktiválja ezen enzimek inhibitorát (76). Mivel a dUTPáz igen fontos a báziskivágásos és egyéb javítómechanizmusokban, valószínűleg a kalcium gátló hatása szerkezetileg adott, aztán az evolúció finomított még rajta. Nemrégiben a kalpain kalciumregulált cistein proteáz fehérje kölcsönható partnereit vizsgálták *in vivo* Schneider S2 *Drosophila melanogaster* sejtekben, és a tömegspektrometriásan beazonosított kötődő partnerek egyikének a dUTPáz adódott (74).

A dUTPáz fémionokhoz való affinitásának jobb feltérképezése érdekében végeztem kompetíciós méréseket is a fémionokkal, amikor az 5 mM Mg^{2+} mellé még 5 mM koncentrációban másik fémiont adtam a rövid *Drosophila* illetve *E. coli* dUTPázt tartalmazó oldathoz (4.10.táblázat). A megfelelő kinetikai paramétereket összehasonlítva levontam néhány következtetést:

A Ca^{2+} és Ba^{2+} iont a Mg^{2+} erősen kiszorítja, valószínűleg eltérő méretük és koordinatív környezetük miatt sokkal gyengébben kötődnek a komplexhez. Érdekes módon a stronciumiont nem tudja a magnéziumion teljesen kiszorítani. Az ólomion kicsapódik pH=7,5-ön, így hatása nem vizsgálható. A higanyion és magnéziumion között ugyancsak jelentős a versengés, a toxikus fémion és a magnéziumion kötődése ugyanabba a nagyságrendbe esik.

<i>E. coli</i> dUTPáz + Mg ²⁺	k _{cat} / s ⁻¹	K _M / μM	k _{cat} / K _M μM ⁻¹ s ⁻¹
-	11±1	0,62±0,3	13±1
Ca ²⁺	11±1	2,0±0,3	5,2±1
Sr ²⁺	10±1	1,1±1	8,2±1
Ba ²⁺	11±1	2,2±1	4,6±1
SD dUT+ Mg ²⁺			
-	15±1	1,1±0,3	15±1
Co ²⁺	16±2	0,98±0,3	16±2
Ni ²⁺	17±3	1,8±0,3	9,4±2
Mn ²⁺	9,6±1	1,1±0,1	8,7±1
Ca ²⁺	14±2	1,1±0,2	13±2
Sr ²⁺	15±1	1,8±0,1	8,3±1
Ba ²⁺	15±2	0,8±0,1	19±2
Hg ²⁺	5,5±1	1,5±0,2	3,7±1
Zn ²⁺	10±1	4,3±0,4	2,3±1

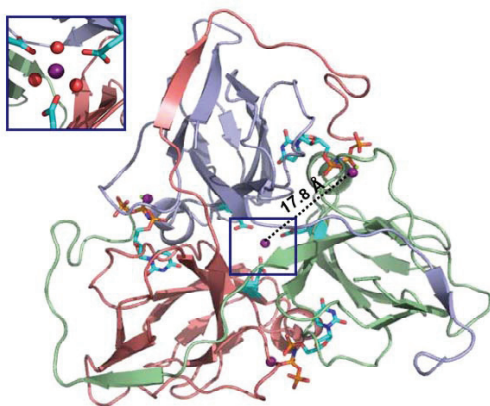
4.10. táblázat Kompetíciós mérések: kinetikai paraméterek 5mM Mg²⁺ és 5mM egyéb fémion jelenlétében

Nagyon fontos megemlíteni, hogy a *D. melanogaster* dUTPáz igen jelentős aktivitást mutat fémion kofaktor hiányában is. Ez az eredmény jó egyezést mutat korábban publikált *E. coli* dUTPáz adatokkal (52), tehát érdekes módon a dUTPázok körében ez a jelenség általánosnak mondható. Erre magyarázatot találhatunk a k_{cat} és K_M értékek, a sejtbeli nukleotid koncentrációk, valamint a DNS polimeráz katalitikus paramétereit vizsgálva (*E. coli* DNS polimeráz I K_M=2,1 μM dTTP-re és dUTP-re egyaránt (72)). Az alacsony k_{cat} hosszú átmeneti időt jelent, a hosszú átmeneti idő pedig különleges specificitást, mivel a szubsztrát így több időt tölt az aktív helyen, így az enzim elkerüli a véletlenül kötődött ligandumok fölösleges hidrolízisét. A dUTPázok alacsony k_{cat} értékének lehetséges magyarázata a sejtbeli nukleotid-trifoszfát koncentrációkban rejlik; normál élő sejtben: [ATP]=3,152±1,698 mM, [GTP]=468±224 μM, [UTP]=567±460 μM, [CTP]=278±242 μM; osztódó sejtben: [dATP]=24±22 μM, [dGTP]=5,2±4,5 μM, [dCTP]=29±19 μM, [dTTP]=37±30 μM, míg összehasonlításképpen a dUTP koncentrációja körülbelül csak 0,2 μM (21). Mivel ilyen alacsony a dUTP koncentráció, szükség van a hosszú átmeneti időre és alacsony K_M-re. A dUTPáznak azért van szüksége a Mg²⁺ kofaktorra, hogy a K_M-et a DNS polimeráz K_M-je alá csökkentse, ezáltal megakadályozva az uracil beépülését a DNS-be, arra viszont nincs szükség, hogy a k_{cat} -ot több nagyságrenddel meggyorsítsa, hiszen úgy a sejt jelentős energiát pazarolna el más aktív centrumhoz kötődött ligandumok hidrolízisére.

A dUTPáz fémkötő tulajdonságainak jobb megértése érdekében további kísérleteket terveztem, melyeket a következő fejezetben mutatok be.

4.6. Fémionok szerepe a szerkezetstabilizálásban (1. és 3. saját közlemény)

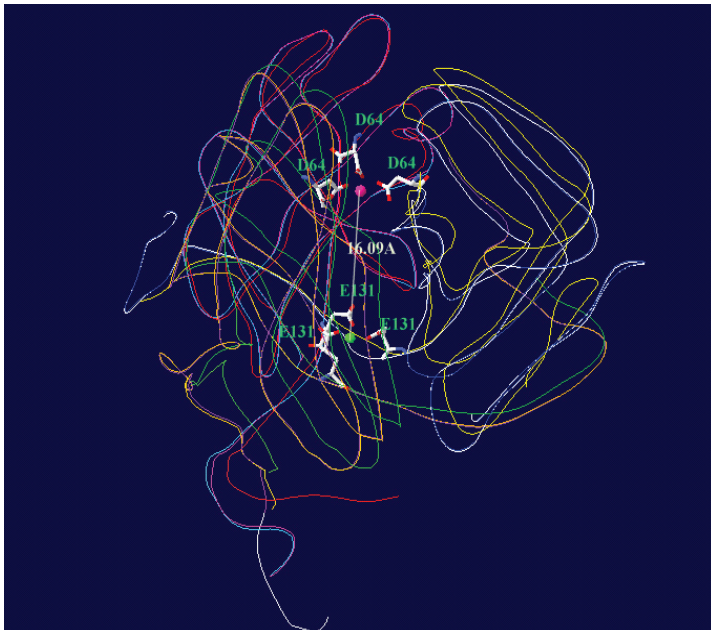
A dUTPáz enzim három alegysége egy globuláris fehérjévé áll össze, a közepén egy központi csatornával, mely prokariótáknál apoláris, eukariótáknál poláris az aminosav oldalláncok tulajdonságai szerint. Az emberi dUTPáz kristályszerkezetében a központi csatornában egy Mg^{2+} ion található, amelynek szerkezetstabilizáló hatását kívántuk igazolni. A humán enzim háromdimenziós szerkezetét felhasználva a *Drosophila melanogaster* dUTPáz szerkezetére homológiamodellt készítettünk (szekvenciaazonosság: 65%) (4.9. ábra).



4.9. ábra A *D. melanogaster* dUTPáz modellezett szerkezete Három alegység: kék, zöld és rózsaszín szalagmodell, Mg^{2+} : lila gömb, víz: piros gömb

A modellszerkezet alapján elmondhatjuk, hogy a poláris központi csatornában a magnéziumion

koordinálásában résztvevő aminosavak szigorúan konzerváltak. A viszonylag alacsony szekvenciaazonosság mellett a konzervált motívumok miatt a humán és a *D. melanogaster* dUTPáz szerkezete nagyon hasonló. Tainer és társai korábban a humán szerkezetből (36) a központi csatornában levő fémiont a 134-es glutamátok koordinációs szférájába jósolták (ez az *ecetmuslica* dUTPázban a 131-es Glu-nak felel meg). Így a humán, valamint az *ecetmuslica* dUTPáz Mg^{2+} -ion koordinálásihelye a FIV dUTPázban találhatóétól mintegy 17 Å-nyire lenne a szerkezetek egymásrillesztésekor (4.10. ábra).



4.10. ábra A FIV és a *D. melanogaster* dUTPáz egymásrillesztett szerkezetei: A két szerkezetstabilizáló fémion relatív pozíciója- Mg^{2+} a humán enzimben zöld gömb, a FIV-ben rózsaszín

Ám ez az elmélet későbbi humán szerkezet alapján (3EHW PDB) tévesnek bizonyult, kiderült, hogy a humán enzimben a 95-ös pozícióban található aszpartátok koordinálják a szerkezeti magnéziumot. Az *ecetmuslica* dUTPáz szerkezetében ugyanebben a pozícióban (91-es pozíció) szintén aszpartát található (4.10. ábra). Az *E. coli* és *D. melanogaster* dUTPáz nagyfokú szerkezetbeli hasonlósága ellenére az *E. coli* központi csatornája apoláris, és azokban a pozíciókban, ahol a humán és a *D. melanogaster* dUTPáz aszpartátot tartalmazott, az *E. coli*

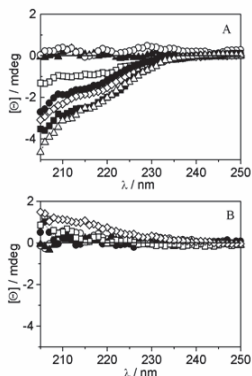
enzimben valinok találhatóak (4.11. ábra).

		Motivum I	Motivum II	Motivum III
Eucarya	DMEL	(15) KIDACVLRFAKLTENALEFVKGSSAARAGVDLS--AYDVVPAKGAIKVRLDQVQFEG-SYGRVPRSLAVRNFLDVG--AGVDRKPSLGVVLFNHS-		
	HSAP	(18) EYVGQWLPFAKLSSEAATPTGSSAARAGVDLS--AYDYTIIPMEAAVKTQIALGEG-CYGRVPRSLAKAMNFIWVG--GVDRKPSLGVVLFNFG-		
	SCER	(2) ATSKVNLILQRSASATVTKGSAATAGVDLYA--SQDITIPAMGGQMVSTDISFTVFVG-TYGRIPRPSGLAVKNGIQTG--GVDRKPSLGVVLFNHS-		
Eubact.	MTUB	--MSTTLAIVRLDPGLPLFSRAHDGAGVDLYS--AEDVELAPGRRLVRTGVAVAVFFG-MVGLVPRPSGLATRVGLSIVNSG--GVDRKPSLGVVLFNFG-		
	ECOL	(2) KKIDVKILDPFVGKEFLFTYATSGAGLDLRACINDAVELAPGDTTLVPTGLAIHIADFSLAAMGPRSGLGKHKHGIVLGNILGLDSIVGQGLMISVNNRG-		
Retrovir.	EIAV	-----MLAYGQTQIKKKRDEEDAGVDLVV--VDIMI PVSDTKIPTDVVKIQVPPN-SFGWVPRSSMAKQGLLNG--GVDRKPSLGVVLFNFG-		
	IFIV	-----MIIEGDGLDKRSDAGVDLYAA--KEIHLLPGEVKVITPGVKMLMPRG-YMGLVPRSGSISGKGLVLVG--GVDRKPSLGVVLFNFG-		
	MPMV	(12) SLWGSQLCSSQQRQPI SKLTRATPFGAGLDLS--TSHTVLTPEMGPQALSTGIYGLFPFN-TFGLIPRPSITMKGLQVVP--GVDRKPSLGVVLFNFG-		
		Motivum IV	Motivum V	
Eucarya	DMEL	DVDFEVKNGRIAGVLCICERIF-YPOLVWVKLEDT---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	182	
	HSAP	KEKFEVKKGRRIAGVLCICERIF-YPEIEEVALDQT---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	163	
	SCER	QRFAFKKGGVRVAGVLEIKLIVDQAGIVVDSLEES---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	147	
Eubact.	MTUB	AAPIVVHRRRIAGVLLVQVRELVELVYSSFDEAGLASTSRGQGGSSGSHASL-----	154	
	ECOL	QDSFTIQPGERRIAGVIFVVPVY-QAEFNLVEDFDT---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	151	
	HINF	NEPKFIEVGRRIAGVIFVVPVY-QAEFNLVEDFDT---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	151	
Retrovir.	EIAV	KGNKLIEGCKRAGVILILQHSNRSQPFWDENKIS---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	134	
	IFIV	RKSTILMERQRIAGVILILPCKHEVLGQGVMDSS---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	133	
	MPMV	-NIVTVSGNRIAGVILILPLI---ETONKVVQP---RGRSGFSTGTWDLPAKAQNGKEKAEPGAA	152	

4.11. ábra Különféle fajokban található dUTPáz szekvenciák: Az öt konzervált szekvenciamotivumon belüli aminosavak fekete háttéren szerepelnek. A szerkezeti magnéziumot koordináló aminosavak pirossal eukarióták : E, prokariótáknál (*E. coli*): V, DMEL: *Drosophila melanogaster*, HSAP: *Homo sapiens*, SCER: *Saccharomyces cerevisiae*, MTUB: *Mycobacterium tuberculosis*, ECOL: *Escherischia coli*, HINF: *Haemophilus influenzae*, EIAV: *Equine infectious anaemia virus*, IFIV: *Feline immunodeficiency virus*, MPMV: *Mason-Pfizer monkey virus*

Természetesen ezen felül létezik még három katalitikus fémion kötőhely, mivel a magnéziumionnak katalitikus kofaktor szerepe van a hidrolízisben. Ennek a pontos helyét kutatócsoportunkból Barabás Orsolya határozta meg. A prokarióta *E. coli* dUTPáz apoláris központi csatornájában lehetetlen egy fémion kötődése sztérikus és polaritási okok miatt. Az aktív helyen azonban szintén jelen van a kétértékű magnéziumion.

A fehérjék konformációváltozásának detektálására igen elterjedt módszer a CD spektroszkópia (távolsági UV tartomány). A β -redős szerkezetű fehérjéket gyakran 202-209 nm közötti abszorpciós minimumuk alapján azonosítják. A *D. melanogaster* dUTPáz három alegysége egy központi csatornával rendelkező homotrimert alkot (4.11. ábra). Ebben a háromfogású szimmetriával rendelkező csatornában néhány vízmolekula és egy Mg^{2+} -ion helyezkedik el, amelyet glutamát oldalláncok koordinálnak. A kinetikai eredmények ismeretében ugyanazokat a kétértékű fémionokat választottuk, mint az aktivitásmérésekhez. A fémionok ismét három csoportba oszthatók. Az első csoportba soroltam a Mg^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} és Ni^{2+} ionokat, amelyek szignifikáns ellipticitáscsökkenést okoztak a 200-230 nm-es tartományban. A differenciaspektrumok a 4.12. ábrán láthatóak..



4.12. ábra A: CD differenciaspektrumok SD dUTPázsal B: CD differenciaspektrumok *E. coli* dUTPázsal

Ez megfelel ezen fémek kinetikai mérésekben tapasztalt Mg^{2+} - helyettesítő effektusának (4.1. és 4.2. táblázat), azaz nemcsak az enzimkinetika működik ugyanúgy ezen fémek jelenlétében, hanem a megfelelő oldalláncokhoz koordinálódva a szerkezetre is ugyanolyan stabilizáló hatással vannak. A CD jel intenzitásnövekedése a fehérje szerkezetében bekövetkezett változásra utal, stabilizálódik a szerkezet, valószínűleg a kétértékű fémion központi csatornába való koordinációja miatt. A második csoportba sorolható a Sr^{2+} és a Ba^{2+} ion, amelyek nem okoznak szignifikáns változást a CD spektrumban. Erre a legkézenfekvőbb magyarázat, hogy elhelyezkedésük a központi csatornában nagy méretükből adódóan sztérikusan gátolt, illetve más koordinációs preferenciájuk (8-as koordinációs szám) miatt kedvezőtlen. A harmadik csoportban a Ca^{2+} -ion található, amely kis változást idézett elő a spektrumban.

Hasonló kísérleteket végeztem az *E. coli* dUTPázsal, ebben az esetben a fémionok semmilyen változást nem okoztak a CD spektrumokban, tehát a külső oldalláncokhoz való esetleges kötődés okozta szerkezetváltozás kizárt.

A jelenség magyarázata, hogy a *D. melanogaster* dUTPáz központi csatornájába beékelődött kétértékű fémion a szerkezet stabilizálásával az amidcsoportok számára erősebb királis környezetet hoz létre, így a CD jel intenzitása növekszik. Az *E. coli* dUTPáz esetében a szűk, apoláris központi csatornába nem épülhet be kétértékű fémion, így nem tapasztalunk változást a spektrumban.

5. Összefoglalás

Munkám során oldatfázisú szerkezetvizsgálatokat végeztem a DNS épségének biztosításában fontos szerepet betöltő dUTPáz enzimén. Kutatócsoportunk limitált tripszinolízises kísérleteit alátámasztva bebizonyítottam, hogy a *Drosophila* dUTPáz esetében a dUTP-vel izosztérikus α,β -imido-dUTP, sőt, dUDP és a termék dUMP feleslegben való hozzáadása hatására a konzervált V. motívumot tartalmazó C-terminális flexibilitása nagymértékben csökkent, az aktív helyhez rendeződött. Az alegységek közti kooperációra utal, hogy az enzim-termék komplexben is jelen van a zárt konformer. A ligandummal való titrálási kísérletben azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy az aktív hely részleges telítésére mind a három aktív hely konformációja megváltozik, α,β -imido-dUTP, dUDP sőt dUMP esetében is. Ez az eredmény is alátámasztja azt a feltételezésünket, miszerint az eukarióta dUTPázok alegységei nem függetlenek egymástól. Ennek az elméletnek még egy független módszerrel való igazolása céljából szubsztráttelítési görbét vettem föl. A paraméterillesztésből a Hill-koefficiens 2,8-nak adódott, mely erős kooperációra utal.

Munkám másik részében különböző kétértékű fémionok enzimszerkezetre és katalízisre való hatását tanulmányoztam. A fémionokat a mérések eredményeképp mind a prokarióta *E. coli* dUTPáz, mind az eukarióta *D. melanogaster* dUTPáz esetében három csoportba soroltam. Az első csoportba a tartozó fémek (Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+}) nagyságrendileg ugyanynyra növelték meg a k_{cat} -ot és csökkentették a K_M -et, mint a magnézium. A második csoportba a cink tartozik, mely nem okoz szignifikáns változást a kinetikai paraméterekben. A harmadik csoportba az alkáliföldfémionok tartoznak, természetesen a magnézium kivételével, melyek csökkentik a k_{cat}/K_M kinetikai hatékonyságot a fémionmentes reakcióhoz képest. A Ca^{2+} okozta gátlást a preferált 7-es koordinációs szám okozta enzimszerkezetbeli torzulással magyarázhatjuk, az *E. coli* és *D. melanogaster* dUTPázra gyakorolt hatása közötti különbséget pedig azzal, hogy a kalciumion koncentrációváltozásának sokkal nagyobb szerepe van az eukarióta sejtbeli folyamatokban. A CD spektroszkópiás mérések alapján a kobalt-, mangán- és nikkellion képes helyettesíteni az eukarióta enzim központi csatornájában található szerkezeti Mg^{2+} iont. Az *E. coli* dUTPázhoz adva a fémionokat, a CD spektrumban semmilyen változást nem tapasztaltam. Ennek valószínű oka, hogy a kólibaktérium dUTPázának központi csatornája apoláris, szűk, fémionnak nincs benne hely. Az *ecetmuslica* dUTPázban jelenlevő szerkezetstabilizáló magnéziumion magyarázatot adhat a kooperáció jelenségére is, valamint a kalciumion okozta enzimgátlásra is.

Összefoglalva elmondható, hogy a pro- és eukarióta dUTPázok közti katalízisbeli különbségek valószínűleg többnyire szerkezetbeli különbségekre vezethetők vissza.

6. Summary

During my PhD studies, I investigated the solution-phase structure of dUTPases, involved in DNA integrity. In line with our research group's results on limited trypsinolysis, I verified that in the case of the fruitfly dUTPase, the binding of the product dUMP, or the analogues dUDP and α , β -imido-dUTP, induces a conformational change such that the flexibility of the C-terminus-containing conserved Motif V of the enzyme decreases and folds upon the active region. The closed conformer exists in the enzyme-substrate complex indicating cooperation between subunits. As a surprising result obtained during titration experiments, in all three titrations partial saturation of the active sites already induces the completion of the conformational shift with regard to the folding of the Motif 5 residues upon the protein globule. These results argue for some cooperativity in the eukaryotic homotrimer. To further confirm this hypothesis I recorded a substrate saturation curve. Enzyme kinetics was followed by using spectrophotometric continuous enzyme activity assay. Parametric fitting yielded a Hill-coefficient of 2.8, which indicates strong cooperation.

In the second part of my work the effect of various divalent metal ions for enzyme structure and catalysis was investigated. Based on the results of these measurements, the investigated divalent metal ions could be divided into three separate groups for both enzymes. Group I contains divalent metal ions which behave similarly to Mg^{2+} in that these ions (Co^{2+} , Mn^{2+} and Ni^{2+}) increased k_{cat} and decreased K_M on the same order of magnitude as Mg^{2+} . Group II contains Zn^{2+} , with no detectable effect on the kinetic parameters of dUTPase. Group III contains the alkaline earth metals Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} except Mg^{2+} . All three metals decrease the kinetic efficiency k_{cat}/K_M with respect to its value obtained in the absence of any divalent cation. The reason for Ca^{2+} -inhibition might be the odd number seven as the most preferred coordination number caused distortion in the structure of the enzyme. The reason for the difference between *E. coli* and *D. melanogaster* dUTPase is the fact that change of concentration of calcium ion is more important in eukaryotic cell processes. Based on CD measurements the Co^{2+} , Mn^{2+} and Ni^{2+} ions also similar in their Mg^{2+} -mimicking kinetic effect. When similar experiments were conducted with *E. coli* enzyme, no differential CD spectrum could be observed for any of the metal ions. The probable reason for this phenomenon is the lack of the polar central channel, whereby divalent metal ions cannot be accommodated within the inner protein fold. The structure stabilizing magnesium can be an explanation for cooperativity, and calcium caused inhibition of the enzyme too.

To summarize, my results indicate that the reason for the difference between the catalytic mechanism of pro- and eukaryotic dUTPases lies within structural alterations.

7. Irodalomjegyzék

1. el-Hajj H. H, Zhang H, Weiss B. Lethality of a dut (deoxyuridine triphosphatase) mutation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1988 Mar; **170** (3): 1069-75.
2. Gadsen, M. H., McIntosh, E.M., Gane, J.C., Wilson, P.J and Haynes, R.H. dUTP pyrophosphatase in an essential enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* *Embo J* **12**, 4425-31 (1993)
3. Vértessy, B.G. and Toth, J. Keeping uracil out of DNA: physiological role, structure and catalytic mechanism of dUTPases, *Accounts of Chemical Research* **42** (1), 97-106 (2009)
4. Beernink, P. T., Segelke, B.W., Hadi, M.Z., Erzberger, J.P., Wilson III, D.M. and Rupp, B., Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/apyrimidinic endonuclease, Ape1: Implications for the catalytic mechanism *J Mol Biol* **307**, 1023-1034 (2001)
5. Zalatan, J. G., Fenn, T.D. and Herschlag, D., Comparative enzymology in the alkaline phosphatase superfamily to determine the catalytic role of an active-site metal ion *J Mol Biol* **384**, 1174-1189 (2008)
6. Geyer, C. R., Evidence for the metal cofactor independence of an RNA phosphodiester-cleaving DNA enzyme, *Chemistry and Biology* **4**(8), 579-593 (1997)
7. Garrett, D.S., Seok, Y. J., Liao, D. Y., Peterkofsky, A., Gronenborn, A. M. and Clore, G. M., Solution structure of the 30 kDa N-terminal domain of enzyme I of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system by multidimensional NMR. *Biochemistry* **36**: 2517 (1997)
8. Martin., J.R., Mulder, F. A. A., Karimi-Nejad, Y., van der Zwan, J., Mariani, M., Schipper, D. and Boelens, R., The solution structure of serine protease PB92 from *bacillus alcalophilus*, *Structure* **5**: 521 (1997)
9. Helm, L., Merbach, A.E., Water exchange on metal ions: experiments and simulations *Coordination Chemistry Reviews* **187**, 151-181 (1999)
10. Knowles, J. R., Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions *Annu Rev Biochem* **49**, 877-919 (1980)
11. Barabás, O., Pongrácz, V., Kovári, J., Wilmanns, M., Vértessy, B.G. Structural insights into the catalytic mechanism of phosphate ester hydrolysis by dUTPase. *J Biol Chem*, **279**, 42907 – 42915 (2004)
12. Tock, M. R., Frary, E., Sayers, J.R. and Grasby, J. A., Dynamic evidence for metal ion catalysis in the reaction mediated by a flap endonuclease *The EMBO Journal*, **22**, 5 995-1004 (2003)

13. De Vivo, M., Dal Peraro, M., and Klein, M. L., Phosphodiester Cleavage in Ribonuclease H Occurs via an Associative Two-Metal-Aided Catalytic Mechanism *J. Am. Chem. Soc.*, **130** (33), 10955–10962 (2008)
14. Lee, J., Chang, J., Joseph, N., Ghirlando, R. and Yang, Muth complexed with hemi- and unmethylated DNAs: coupling base recognition and DNA cleavage. *W. Mol Cell* **20**: 155-160 (2005)
15. Vipond, I. B., Baldwin, G. S., and Halford, S.E., Divalent metal ions at the active sites of the EcoRV and EcoRI restriction endonucleases, *Biochemistry* **34**(2), 397-704 (1995)
16. Pingoud, A. and Jeltsch, A., Recognition and cleavage of DNA by type-II restriction endonucleases, *Eur J Biochem* **246**(1), 1-22 (1997)
17. Nastri, H. G. et al., Catalytic and DNA binding properties of PvuII restriction endonuclease mutants, *J Biol Chem* **272**(41), 25761-25767 (1997)
18. Mol, C. D., Hosfield, D.J. and Tainer, J. A., Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means *Mutation Research* **460**, 211-229 (2000)
19. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* **362**, 709-15 (1993)
20. Pearl, L. H. and Savva, R. The problem with pyrimidines, *Nat Struct Biol* **3**, 485-487 (1996)
21. Traut, T. W., Physiological concentration of purines and pyrimidines, *Mol Cell Biochem* **140**, 1-22 (1994)
22. Goulian, M. et al. Mechanism of thymineless cell death, *Adv Exp Med Biol* **195 Pt B**, 89-95 (1986)
23. Payne, S. L., Elder, J.H., The role of retroviral dUTPases in replication and virulence, *Curr Protein Pept Sci* **2**, 381-388 (2001)
24. Baldo, A. M. and McClure, M. A. Evolution and horizontal transfer of dUTPase-encoding genes in viruses and their hosts, *J Virol* **73**, 7710-7721 (1999)
25. Strahler, J. R., Zhu, X. X., Hora, N., Wang, Y. K., Andrews, P. C., Roseman, N. A., Neel, J. V., Turka, L. and Hanash, S. M., Maturation stage and proliferation-dependent expression of dUTPase in human T cells, *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 4991-4995 (1993)
26. Moertel, C. G., Chemotherapy for colorectal cancer *New England Journal of Medicine* **330**, 1136-1142 (1994)
27. Aherne, G. W. and Browne, S., Antifolate drugs in cancer therapy, *Anticancer Development Guide*, 409-421 (Humana Press 1999).

28. Canman, C.E., Radany, E.H., Parsels, L. A., Davis, M. A., Lawrence, T. S., Maybaum, J. Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity and DNA damage in human tumor cells by expression of *Escherichia coli* deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res.* **54**(9), 2296-8 (1994)
29. Zalud, P., Wachs, W. O., Nyman, P. O., Zeppenauer, M. M., Inhibition of the proliferation of human cancer cells in-vitro by substrate-analogous inhibitors of dUTPase. *Adv ExpMed Biol.* **370**: 135-8 (1994)
30. Igney, F. H. and Krammer, P. H., Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat Rev Cancer* **2**, 277-288 (2002)
31. Munoz-Pinedo, C., Oliver, F.J. and Lopez-Rivas, A., Apoptosis of hematopoietic cells upon thymidilate synthase inhibition is independent of p53 accumulation and CD95-CD95 ligand interaction, *Biochem J* **353**, 101-108 (2001)
32. Nord, J., Kiefer, M., Adolph, H. W., Zeppenauer, M. M. and Nyman, P. O., *Febbs Lett* **472**, 312-316 (2000)
33. Vértessy, B. G., Flexible glycine rich motif of *Escherichia coli* deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase is important for functional but not for structural integrity of the enzyme, *Proteins* **28**(4), 568-579 (1997)
34. Fiser, A. and Vertessy, B. G., Altered Subunit Communication in Subfamilies of Trimeric dUTPases, *Biochem Biophys Res Commun* **279**(2), 534-542 (2000)
35. Larsson, G., Svensson, L. A. and Nyman, P.O., Crystal Structure of the *Escherichia coli* dUTPase in complex with a substrate analogue (dUDP), *Nat Struct Biol* **3**(6), 532-538 (1996)
36. Mol, C. D. et al., Human dUTP pyrophosphatase: uracil recognition by a beta hairpin and active sites formed by three separate subunits, *Structure* **4**(9), 1077-1092 (1996)
37. Gonzalez, A., Larsson, G., Persson, R. and Cedergren-Zeppenauer, E., Atomic resolution structure of *Escherichia coli* dUTPase determined ab initio. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 767-74. (2001)
38. Dauter, Z. et al., Crystal structure of dUTPase from equine infectiousanaemia virus; active site metal binding in a substrate analogue complex, *J Mol Biol* **285**(2), 655-673 (1999)
39. Björnberg, O., Nyman, P. O., The dUTPases from herpes simplex virus type 1 and mouse mammary tumour virus are less specific than the *Escherichia coli* enzyme. *J Gen Virol.* **12**, 3107-11 (1996)
40. Prasad, G. S., Stura, E. A., Elder, J. H., and Stout C. D. Structures of feline immunodeficiency virus dUTP pyrophosphatase and its nucleotide complexes in three crystal forms *Acta Cryst D Biol Cryst* **56**, 1100-1109 (2000)

41. Chan, S. et al., Crystal structure of the *Mycobacterium tuberculosis* dUTPase: insights into the catalytic mechanism *J Mol Biol* **341**, 503-517 (2004)
42. Samal, A., Schormann, N., Cook, W. J., DeLucas, L. J. and Chattopadhyay, D., Structures of vaccinia virus dUTPase and its nucleotide complexes *Acta CrystD Biol Cryst* **63**, 571-580 (2007)
43. Whittingham, J. L. et al., dUTPase as a platform for antimalarial drug design: structural basis for the selectivity of a class of nucleoside inhibitors *Structure* **13**, 329-338 (2005)
44. Huffman, J. L., Li, H., White, R. H. and Tainer, J. A., Structural basis for recognition and catalysis by the bifunctional dCTP deaminase and dUTPase from *Methanococcus jannaschii* *J Mol Biol* **331**, 885-896 (2003)
45. Nemeth-Pongracz, V. et al., Flexible segments modulate co-folding of dUTPase and nucleocapsid proteins *Nucleic Acids Res* **35**, 495-505 (2007)
46. Varga, B., Barabas, O., Kovari, J., Toth, J., Hunyadi-Gulyas, E., Klement, E., Medzihradszky, K., Tolgyesi, F., Fidy, J. and Vertessy, B. G., Active site closure facilitates juxtaposition of reactant atoms for initiation of catalysis by human dUTPase *Febs Lett* **581**, 4783-4788 (2007)
47. Varga, B., Barabas, O., Takacs, E., Nagy N., Nagy, P. and Vertessy B. G., Active site of mycobacterial dUTPase: structural characteristic and built –in sensor *Biochem Biophys Res Commun* **373**, 8-13 (2008)
48. Persson, R., Nord, J., Roth, R. and Nyman, P. O., dUTPase from *Escherichia coli*: high-level expression and one-step purification, *Prep Biochem Biotechnol* **32**, 157-172 (2002)
49. Laemmli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680-685 (1970)
50. Bradford, M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976)
51. Mustafi, D., Békési, A., Vértessy, B. G. and Makinen, M. W., The catalytic and structural role of the metal ion binding dUTP pyrophosphatase, *Proc Natl Acad Sci USA* **100** (10), 5670-5675 (2003)
52. Larsson, G., Nyman, P.O. and Kvassman, J.O., Kinetic characterization of dUTPase from *Escherichia Coli*, *J Biol Chem* **271(39)**, 24010-24016 (1996)
53. Dudgeon, H., Dietrich, W. and Tóth, G., Structure Elucidation by Modern NMR *Springer* (1998)
54. Tripos, I. SYBYL, Version 6.5., Tripos, St. Louis, MO (1998)

55. Greenfield, N. J., Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions *Nature Protocols* **1**, 2527 - 2535 (2007)
56. Venters, R. A., Thompson, R. and Cavanagh, J., Current Approaches for the Study of Large Proteins by NMR. Invited manuscript for *J Mol Struct* **602-603**, 275-292 (2002)
57. Vertessy, B. G., Larsson, G., Persson, T., Bergman, A. C., Persson, R., Nyman, P. O., The complete triphosphate moiety of non-hydrolyzable substrate analogues is required for a conformational shift of the flexible C-terminus in E. coli dUTP pyrophosphatase. *FEBS Lett* **421**(1), 83-88 (1998)
58. Toth, J., Varga, B., Kovacs, M., Malnasi-Csizmadia, A. and Vertessy B. G. Kinetic mechanism of human dUTPase, an essential nucleotide pyrophosphatase enzyme, *J Biol Chem* **282**, 33572-33582 (2007)
59. Larsen, M., Willet, R. and Yount, R. G., Imidodiphosphate and pyrophosphate: possible biological significance of similar structures *Science* **166**, 1510 (1969)
60. Yount, R. G., Ojala, D. and Babcock, D., Interaction of P-N-P and P-C-P analogs of adenosine triphosphate with heavy meromyosin, myosin, and actomyosin. *Biochemistry* **10**, 2490-2496 (1971)
61. Nord, J., Nyman, P. O., Larsson, G. and Drakenberg, T., *FEBS Lett* **492**, 228-232 (2001)
62. Hill, A. V. The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol (Lond.)* **40**, 4-7 (1910)
63. Vértessy, B. G., Persson, R., Rosengren, A. M., Zeppenauer, M. and Nyman, P. O., *Biochem Biophys Res Commun* **219**, 294-300 (1996)
64. Nyman, P. O., Introduction *Curr Protein Pept Sci* **2**, 277-285 (2001)
65. Rath, V. L., Lin, K., Hwang, P. K. and Fletterick, R. J., The evolution of an allosteric site in phosphorylase. *Structure* **4**, 463-473 (1996)
66. Hudson, J. W., Golding, G. B. and Crerar, M. M., "Evolution of allosteric control in glycogen phosphorylase" *J Mol Biol* **234**, 700-721 (1993)
67. Peterson, P.E. and Smith, T.J., The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery *Structure Fold Des* **7**, 769-782 (1999)
68. Wiley, J. S. and McCulloch, K. E., Calcium ions, drug action and the red cell membrane, *Pharmacol Ther* **18**(2), 271-292 (1982)
69. Fuxreiter, M., Farkas, Ö. and Náray-Szabó, G., Molecular modelling of xylose isomerase catalysis: the role of electrostatics and charge transfer to metals, *Protein Eng* **8**(9), 925-933 (1995)

70. Fuxreiter, M. et al., Role of electrostatics at the catalytic metal binding site in xylose isomerase action: Ca(2+)-inhibition and metal competence in the double mutant D254E/D256E, *Proteins* **28(2)**, 183-193 (1997)
71. Yamaguchi, M. and Sakurai, T., Reversible effect of calcium-binding protein regucalcin on the Ca(2+)-induced inhibition of deoxyuridin 5'-triphosphatase activity in rat liver cytosol, *Mol Cell Biochem* **110(1)**, 25-29 (1992)
72. McClure, W. R. and Jovin, T. M., The steady state kinetic parameters and non-processivity of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid polymerase I., *J Biol Chem* **250(11)**, 4073-4080 (1975)
73. Kovari, J., Barabas, O., Varga, B., Bekesi, A., Tolgyesi, F., Fidy, J., Nagy, J. and Vertessy, B. G., Methylene substitution at the alpha-beta bridging position within the phosphate chain of dUDP profoundly perturbs ligand accommodation into the dUTPase active site. *Proteins* **71** 308-19 (2008).
74. Bozoky, Z., Alexa, A., Dancsok, J., Gogl, G., Klement, E., Medzihradszky, K. F. and Friedrich, P., Identifying calpain substrates in intact S2 cells of *Drosophila*. *Arch Biochem Biophys* **481**, 219-25 (2009)
75. Ribeiro, J. M. and Carson, D. A., Calcium/magnesium-dependent endonuclease from human spleen: Purification, properties, and role in apoptosis, *Biochemistry* **32**, 9129-9136 (1993)
76. McConkey, D. J., Calcium-dependent, Interleukin 1 β -converting Enzyme Inhibitor-insensitive Degradation of Lamin B₁ and DNA Fragmentation in Isolated Thymocyte Nuclei *J Biol Chem* **271**, 22398-22406 (1996)

8. Közlemények listája

A DOLGOZAT TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ FOLYÓIRAT CIKKEK

1. 2004 Altered Active Site Flexibility and a Structural Metal-binding Site in Eukaryotic dUTPase: Kinetic Characterisation, Folding, and Crystallographic Studies of the Homotrimeric *Drosophila* Enzyme: J. Kovári, O. Barabás, E. Takács, A. Békési, **Zs. Dubrovay**, V. Pongrácz, I. Zagyva, T. Imre, P. Szabó and B. G. Vértessy *J. Biol. Chem.* 279, 17932-44.

2. 2004 Multidimensional NMR Identifies the Conformational Shift Essential for Catalytic Competence in the 60 kDa *Drosophila melanogaster* dUTPase Trimer: **Zs. Dubrovay**, Z. Gáspári, É. Hunyadi-Gulyás, K. F. Medzihradsky, A. Perczel and B. G. Vértessy, *J. Biol. Chem.* 279 No.17.17945-50.

3. 2009 Divalent metal ion specificity in pro- and eukaryotic dUTPases: **Zs. Dubrovay** and B.G. Vértessy (szerkesztői vélemény alapján ártirt verzió közlésre visszaküldve PlosOne folyóiratba)

FOLYÓIRATBAN MEGJELENT ABSZTRAKTOK

2002 dUTPase-dependent preventive DNA repair via exclusion of uracil : J. Kovári, A. Békési, O. Barabás, **Zs. Dubrovay**, I. Zagyva, E. Takács, P.Szabó, T. Imre, A. Erdei, A. Perczel and B. G. Vértessy, *Eur. J. Biochem* 269 *PSI* 41, 2002,

2002 Structural Studies of *Drosophila melanogaster* dUTPase: O. Barabás, **Zs. Dubrovay**, V. Harmat, J. Kovári, E. Takács, I. Zagyva, G. Náray-Szabó, B. G. Vértessy *Acta Cryst. A58 (supplement)*, C96.,

2005 Same fold but altered responsivity in the evolution of dUTPase homotrimer: E. Takacs, O. Barabas, D. Svergun, **Zs. Dubrovay**, V. K. Grolmusz, B. G. Vértessy *FEBS JOURNAL* 272, 100

POSZTER

2002 Összehasonító NMR és röntgendiffrakciós vizsgálatok egy homotrimer enzimen: **Zs. Dubrovay**, O. Barabás, J. Kovári, I. Zagyva, V. Harmat, Z. Gáspári, A. Perczel, Keszthely

SZÓBELI ELŐADÁSOK

2002 Form, function, and development in the homotrimeric dUTPase family: O. Barabás, J. Kovári, A. Békési, **Zs. Dubrovay**, I. Zagyva, E. Takács, P. Szabó, A. Perczel, E. Kókay, J. Nagy, **B. G. Vértessy**, International Howard Hughes Research Scholar Meeting, Palm Cove, Australia

2003 A dUTPáz enzimesalád szerkezeti biológiája: Katalitikus mechanizmus felderítése szerkezeti alapon (HE-3): **O. Barabás**, **Zs. Dubrovay**, V. Pongrácz, J. Kovári, Z. Gáspári, E. Takács, I. Zagyva, A. Perczel, G. Náray-Szabó, B. G. Vértessy, A Magyar Biokémiai Egyesület Molekuláris Biológiai Szakosztálya 6. munkaértekezlete, Sárospatak

EGYÉB FOLYÓIRATCIKK

2001 A systematic theoretical investigation of the valence excited states of the diatomic molecules B₂, C₂, N₂ and O₂: T. Müller, M. Dallos, H. Lischka, **Zs. Dubrovay**, P. G. Szalay
Theor. Chem. Acc. Vol 105 N3 Jan.2001

EGYÉB ELŐADÁS

2009 Aki kérdez: FDA Aki válaszol: SZKO (+KAO) (+TFL I.) Fázis II-ben marad az RGH-188 vagy mehet tovább? **Zs. Dubrovay**, Z. Szakács, G. Balogh, Cs. Szántay, V. Háda, **J. Kóti**, H. Hevér és M. Dékány Velence, III. Richter Kutatási Fórum

EGYÉB POSZTER

2001 MR-AQCC investigation of decomposition mechanism of three membered rings containing sulfur and oxygen: **Zs. Dubrovay**, P. G. Szalay, Debrecen